

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere
Medizin der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. Virchow

Wirkung von inhaliertem Salmeterol auf die bronchiale Hyperreagibilität und die BDNF-Thrombozytenbeladung von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock



von Yvonne Rennau, geb. Lindner

geb. am 25.01.1982 in Rostock

Rostock 2011

Dekan

Prof. Dr.med. Emil Christian Reisinger

Gutachter

Priv.-Doz. Dr. Marek Lommatzsch
Oberarzt der Abteilung für Pneumologie
Zentrum für Innere Medizin
Universität Rostock
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock, Germany

Prof. Stephan Sorichter
Abteilung Pneumologie
Universitätsklinikum Freiburg
Killianstr. 5
79106 Freiburg im Breisgau

Prof. Bernd Drewelow
Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie
im Zentrum für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Schillingallee 70
18057 Rostock

Datum der Einreichung: 12.07.2011

Datum der Verteidigung 19.09.2012

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Asthma bronchiale	1
1.1.1	Definition und Prävalenz	1
1.1.2	Pathophysiologie des allergischen Asthma	3
1.1.3	Innervation der Lunge und neuronale Veränderungen beim Asthma	4
1.2	Neurotrophine und Asthma	9
1.2.1	Neurotrophine	9
1.2.2	BDNF	10
1.2.3	BDNF und Asthma	12
1.3	Inhalative Beta2-Sympathomimetika in der Asthmatherapie	13
1.4	Fragestellung	17
2	Methoden	18
2.1	Ein- und Ausschlusskriterien der Studie	18
2.2	Studiendesign	19
2.3	Gewinnung und Verarbeitung der Blutproben	21
2.4	Bodyplethysmographie	22
2.5	ELISA	27
2.6	Bestimmung des Beta2-Rezeptor-Polymorphismus	30
2.7	Statistik	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Patientencharakteristika	31
3.2	Lungenfunktion und Atemwegshyperreagibilität	32
3.3	BDNF-Konzentrationen in Serum, Thrombozyten und Plasma	33

3.4	Zusammenhang zwischen den Veränderungen der BDNF-Konzentrationen und der PC ₂₀	33
3.5	Bedeutung des Beta2-Rezeptor-Polymorphismus	33
4	Diskussion	40
4.1	Wirkungen von Salmeterol	41
4.2	Wirkungen von Fluticason	42
4.3	Einfluss von Beta-Rezeptor-Polymorphismen	43
4.4	Andere mögliche Wirkungen einer Salmeterol-induzierten BDNF-Steigerung	43
4.5	Methodenkritik	46
4.6	Hypothese	47
5	Zusammenfassung	49

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

1.1.1 Definition und Prävalenz

Das Asthma bronchiale ist laut Definition der "Global Initiative for Asthma (GINA)" eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die mit anfallsweise auftretenden, reversiblen Bronchialobstruktionen vergesellschaftet ist [1].

In Deutschland sind fünf Prozent aller Erwachsenen und bis zu zehn Prozent der Kinder betroffen [2], wobei die Prävalenz der Asthma-Erkrankungen über Jahre kontinuierlich zugenommen hat und nach neuen Studien erst kürzlich in den westlichen Ländern zum Stillstand gekommen zu sein scheint [3].

Bislang am weitesten verbreitet ist eine Unterteilung in das intrinsische Asthma einerseits, welches häufig erst im Erwachsenenalter auftritt und in der Regel nicht mit Allergien oder einer atopischen Familienanamnese vergesellschaftet ist, und das allergische Asthma andererseits [4]. Wesentliche Merkmale des Letzteren sind die allergische Atemwegsentszündung, die variable Atemwegsobstruktion und die bronchiale Hyperreaktivität gegenüber unspezifischen Stimuli (Kälte, Anstrengung), welche sich auch durch die Inhalation von Reizsubstanzen (z.B. Methacholin oder Histamin) provozieren läßt. Beiden Formen gemein ist die chronische Entzündung der Atemwege, die bis vor einigen Jahren als Hauptursache asthmatypischer Symptome angesehen wurde. Man geht jedoch mehr und mehr dazu über, auch

strukturellen Veränderungen in der Lunge einen wesentlichen Beitrag zur Symptomatik des Asthma zuzuschreiben. So wurde in großangelegten klinischen Studien gezeigt, dass eine Reduktion der Atemwegsentzündung durch die spezifische Hemmung von Immunglobulin E oder Interleukin-5 mittels monoklonaler Antikörper (Omalizumab beziehungsweise Mepolizumab) weder die allergen-induzierte Bronchokonstriktion noch die bronchiale Hyperreagibilität in einer unselektiven Population von Patienten mit Asthma beeinflussen konnte [5, 6]. In selektierten Populationen mit schwerem allergischen oder eosinophil dominiertem Asthma können diese spezifischen antiinflammatorischen Therapiestrategien jedoch wirksam sein [7]. Dies unterstreicht die Bedeutung einer genauen Charakterisierung von Patienten mit Asthma bronchiale. Inhalative Steroide hingegen nehmen nicht nur auf Entzündungszellen sondern ebenso auf Strukturzellen der Lunge (wie Epithelien, Neuronen und Muskelzellen) Einfluss. Dies erklärt, warum sie Mittel der ersten Wahl in der Asthmatherapie sind, und zwar unabhängig vom spezifischen Phänotyp beziehungsweise Subtyp des Asthma bronchiale.

Das aktuelle Ursachenkonzept beinhaltet somit neben genetischen und psychischen Faktoren und Umwelteinflüssen ein Zusammenspiel aus neuromuskulärer Hyperreagibilität, Strukturveränderungen der Lunge und chronischer Entzündung. Dieses Zusammenspiel mündet in das Hauptcharakteristikum des Asthma bronchiale: die bronchiale Hyperreagibilität.

Als bronchiale Hyperreagibilität wird die für das Asthma bronchiale charakteristische Übererregbarkeit der Atemwege bezeichnet. Sie lässt sich mittels unspezifischem inhalativem Provokationstest objektivieren. Hierbei kommt es durch Inhalation von niedrigen Dosen von Histamin oder Methacholin zu einer Atemwegsobstruktion, die bei Gesunden in diesem Dosisbereich noch nicht auftreten würde. Diese Obstruktion lässt sich durch einen Abfall der FEV_1 (expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde) quantifizieren. Die Histaminkonzentration, die notwendig ist, um die FEV_1 auf 20% zu senken, wird mit PC_{20} benannt [8]. Der Normalwert beträgt > 8 mg/ml, beim Asthma bronchiale ist er definitionsgemäß < 8 mg/ml.

1.1.2 Pathophysiologie des allergischen Asthma

Patienten mit allergischem Asthma bronchiale leiden häufig schon im Kleinkindalter unter Hautsymptomen und uncharakteristischen respiratorischen Beschwerden. Als Erwachsene entwickeln sie dann die charakteristischen, oft saisonal akzentuierten Symptome. Zu den Allergenen, die einen Asthmaanfall provozieren können, gehören unter anderem Gräser-, Baum-, Getreidepollen, Tierhaare, Schimmelpilzsporen sowie der Kot von Hausstaubmilben. Hauptcharakteristikum des Asthma bronchiale ist jedoch die Hyperreagibilität auf unspezifische Reize wie kalte Luft [9].

Den Ausgangspunkt der allergischen Atemwegsentzündung stellen pulmonale Dendritische Zellen (antigen presenting cells, APC) dar, welche in der Mucosa der Atemwege ansässig sind, die Allergene aufnehmen, verarbeiten und in den drainierenden Lymphknoten allergenspezifischen T-Zellen mit Hilfe ihrer MHC-II-Rezeptoren (MHC: major histocompatibility complex) präsentieren. Es kommt typischerweise zur klonalen Selektion von spezifischen T-Helferzellen (CD4-positive T-Lymphozyten), welche durch die Ausschüttung von Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) zur Ausdifferenzierung aktivierter B-Zellen in Immunglobulin E (IgE) produzierende Zellklone, dem sogenannten "Switch" führen [10].

Die gebildeten antigenspezifischen IgE-Antikörper treffen auf hoch affine Rezeptoren (FcεRI) an der Oberfläche von Mastzellen und initiieren deren Sensibilisierung. Alle nachfolgenden Antigenkontakte setzen durch direkte Interaktion des Allergen-Antikörper-Komplexes mit dem FcεRI-Rezeptor Mediatoren wie Histamin, Prostaglandin und Leukotriene frei, welche Entzündung, Bronchokonstriktion und Ödembildung mit Dyskrinie (Hypersekretion eines zähen Schleims) hervorrufen. Dieser Mechanismus gilt als wichtigster Auslöser der allergischen Sofortreaktion [11]. Darüber hinaus ist eine chemotaktische Wirkung auf weitere Entzündungszellen und deren Aktivierung bekannt. Dies wurde als möglich Erklärung der mit einer zeitlichen Latenz von mehreren Stunden auftretende Spätreaktion vorgeschlagen. Jüngste Studien zeigen jedoch, dass das Maximum der allergen-induzierten Atemwegsentzündung bei Asthma keineswegs mit dem Zeitpunkt der Spätreaktion (4-12 Stunden nach Exposition) korreliert. Somit scheinen andere Mechanismen für die Spätreaktion maßgeblich zu sein [12].

Die Infiltration der Atemwege mit allergenspezifischen T-Zellen hat weiterhin die Anlockung eosinophiler Granulozyten mittels Interleukin-5 zur Folge [13, 14]. Ebenfalls steigt ihre Anzahl und die ihrer Mediatoren im peripheren Blut. Diese Parameter korrelieren zwar mit dem Schweregrad der allergischen Entzündung, eine Verwendung als klinischer Verlaufsparemeter beim allergischen Asthma ist möglich. Allerdings stehen sie nicht im Zusammenhang mit der Schwere der Atemwegsobstruktion. Somit wird diskutiert, ob Eosinophile zur Atemwegsobstruktion beim Asthma beitragen oder aber im Gegenteil sogar positive Auswirkungen auf die Verengung der Atemwege haben könnten [15]. Letztere Hypothese wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass das Maximum der Eosinophileninfiltration nach Allergenexposition im Augenblick des Rückgangs der Obstruktion auftritt [12]. Als eine weitere immunologisch bedeutsame Zellgruppe sind die Alveolarmakrophagen zu nennen. Sie stellen sowohl bei Gesunden wie Asthmatikern den Hauptanteil der durch eine BAL aus den unteren Atemwegen gewonnenen Zellpopulationen. Bei Patienten mit allergischem Asthma zeigen sie jedoch einen veränderten Aktivierungsgrad: Die Allergenstimulation bewirkt hier eine Freisetzung von Peroxidradikalen und Mediatoren wie IL - 1, Leukotrien B4 (LTB4), Prostaglandin F2a (PGF2a) und Platelet-activating Factor (PAF) aus den Makrophagen. Sie spielen somit eine Rolle bei der Soforttypreaktion [16, 17].

Durch wiederholte Allergenkontakte kommt es durch die Chronifizierung der Atemwegsentzündung beim allergischen Asthma bronchiale zum sogenannten *Airway remodeling* [18]: das Epithel zeigt eine Hyperplasie Mucus-produzierender Becherzellen, die Basalmembran ist verdickt, die Submukosa verändert ihre Beschaffenheit, die glatte Bronchialmuskulatur ist ebenfalls deutlich hypertrophiert. Zudem kommt es in den Atemwegen von Patienten mit Asthma bronchiale zu funktionellen Veränderungen sensorischer und motorischer Nerven (Abbildung 1.1). Auf diese Veränderungen soll im nächsten Abschnitt eingegangen werden.

1.1.3 Innervation der Lunge und neuronale Veränderungen beim Asthma

Derzeit wird die bronchiale Hyperreagibilität auf postinflammatorische Veränderungen ortsansässiger Zellen der Lunge zurückgeführt. Insbesondere die Veränderung

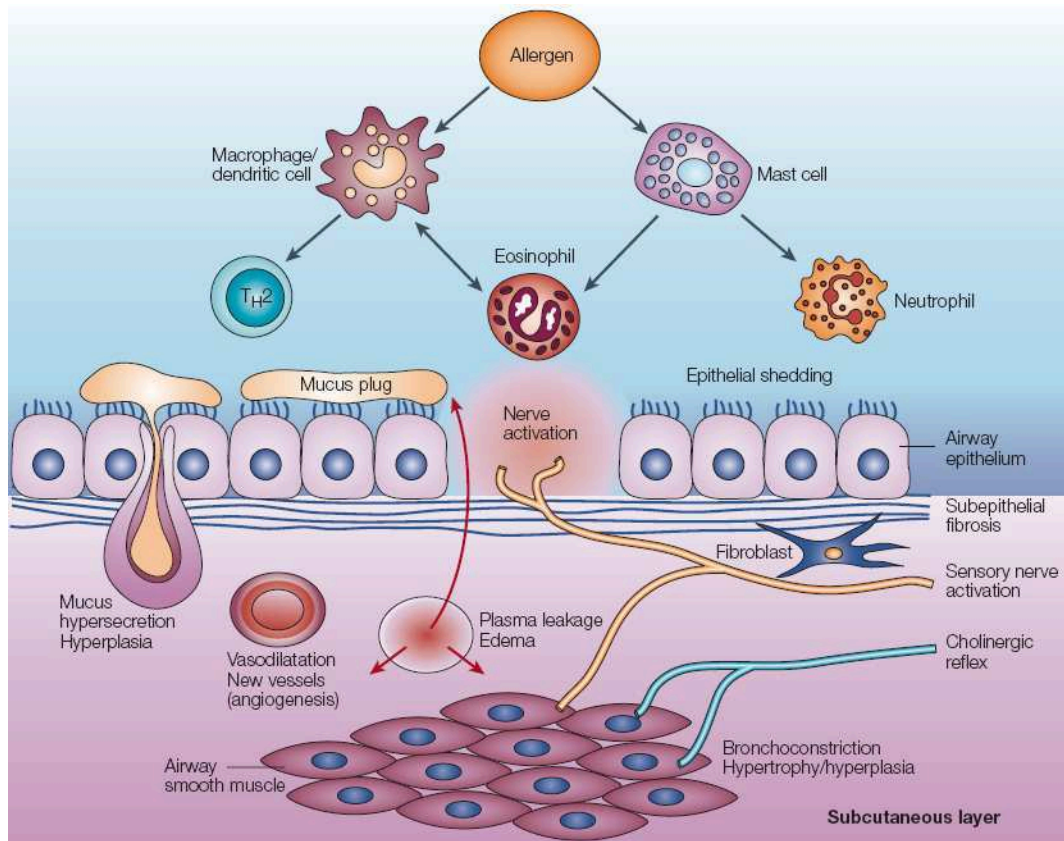


Abbildung 1.1: Pathophysiologie der bronchialen Schleimhaut beim Asthma bronchiale (*entnommen aus [19]*).

neuronaler Parameter scheint hierbei von Bedeutung zu sein.

Die Efferenzen

Die efferente Innervation der unteren Atemwege ist ein Zusammenspiel von Sympathikus und Parasympathikus.

Im N. vagus ziehen präganglionäre parasympathische Fasern aus dem Nucleus dorsalis nervi vagi und dem Nucleus ambiguus in die Lunge, wo sie auf postganglionäre Neurone in den Wandungen der Atemwege umgeschaltet werden. Muskarinerge Rezeptoren binden den parasympathischen Transmitter Acetylcholin und vermitteln so Bronchokonstriktion, Vasodilatation und Drüsenaktivierung [20, 21].

Die präganglionären efferenten sympathischen Nervenfasern ziehen aus thorakalen und lumbalen Segmenten des Rückenmarks (vor allem Nucleus intermediolateralis) über die Vorderwurzel zum Grenzstrang, um dort in paravertebralen Ganglien umgeschaltet zu werden oder direkt zu den prävertebralen Ganglien weiter zu ziehen. Trachea und Lunge werden über postganglionäre Fasern vom Ganglion cervicale superius, Ganglion stellatum und von oberen thorakalen Grenzstrangganglien versorgt. Haupttransmitter ist hier Noradrenalin. Jedoch erreichen nur sehr wenige sympathische Fasern die Atemwegsmuskulatur [22]. In erster Linie entfaltet der Sympathikus seine dilatierende Wirkung durch zirkulierende Katecholamine und durch Modulation der cholinergen Signaltransmission [23] (Abbildung 1.2).

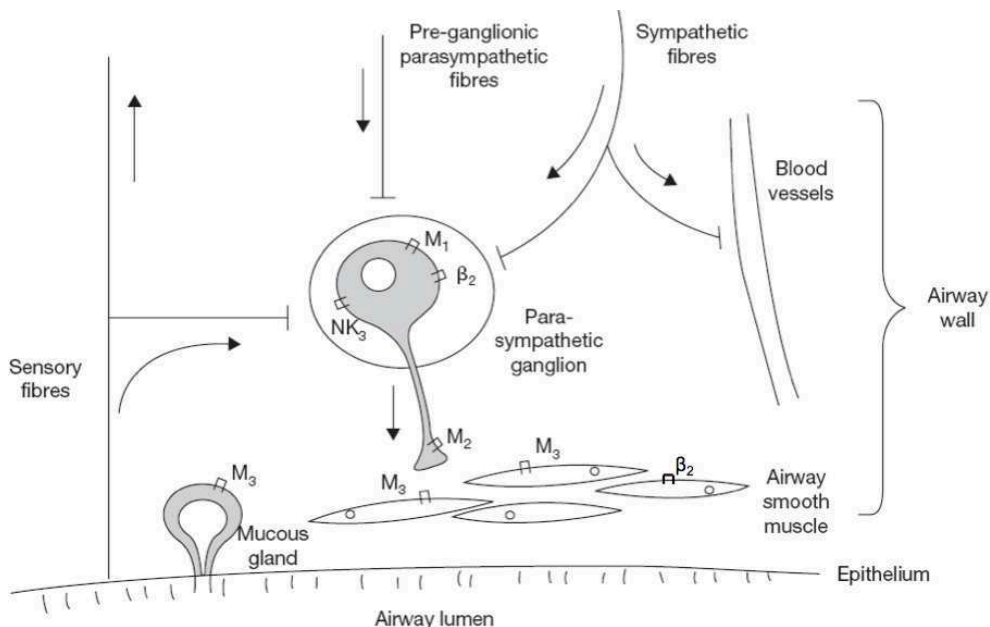


Abbildung 1.2: Innervation der Atemwege (entnommen aus [24]).

Zusätzlich zu den klassischen Mediatoren Noradrenalin und Acetylcholin findet man in der Lunge non-adrenerge und non-cholinerge (NANC) Neurone, die mit Hilfe von Neuropeptiden ausgeprägte pharmakologische Effekte auf den Muskeltonus der Blutgefäße und der Bronchien, die Drüsensekretion und auf Entzündungs- und Immunzellen haben. Sie können in eine exzitatorische und eine inhibitorische Gruppe unterteilt werden. Exzitatorische Neurone (e-NANC) bedienen sich der Tachykinine (z.B. Substanz P, Neurokinin A) um Bronchokonstriktion, Mucussekretion und eine Steigerung der Gefäßpermeabilität zu bewirken. Sie wirken somit

entzündungsfördernd. Inhibitorische Neurone (i-NANC) wirken bronchodilatierend und vasokonstriktorisch. Beispielhaft für ihre Transmitter zu nennen sind hier vor allem das Vasointestinale Peptid (VIP), welches oft in Cotransmission mit Acetylcholin freigesetzt wird, und Stickstoffmonoxid (NO), das in cholinergen Neuronen aus L-Arginin synthetisiert wird [25, 26].

Für die bronchiale Hyperreagibilität beim Asthma ist nach heutigem Erkenntnisstand unter anderem eine Fehlregulation im parasympathischen Schenkel der efferenten Innervation auf intrapulmonaler Ebene anzuschuldigen [27]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Acetylcholinesterase und somit eine übersteigerte Wirkung des Acetylcholins zur Hyperreagibilität führt [28]. Dies wird durch Entzündungsmediatoren noch verstärkt, indem diese die Freisetzung des Neurotransmitters aus den parasympathischen Ganglien oder aus postganglionären Nervenendigungen noch steigern [29]. Zusätzlich steht dies in Wechselbeziehung mit der oben genannten entzündungsfördernden Wirkung, die wiederum die zusammen mit Acetylcholin ausgeschütteten e-NANC haben [30, 29]. Auch eine verminderte Hemmung der ACh-Freisetzung, die physiologischerweise über M2-Rezeptoren reguliert wird, ist bei chronischer Entzündung zu verzeichnen [31]. Eosinophile Granulozyten setzen unter anderem den allosterischen M2-Rezeptorantagonisten Mediator MBP frei, welcher dann die Fehlregulation bedingt [32, 33]. Jüngste Studien, die eine Wirksamkeit von langwirksamen Parasympatholytika bei Asthma zeigen, unterstreichen die Bedeutung des cholinergen Systems für die asthmatische Atemwegsobstruktion [34].

Die Afferenzen

Größtenteils verlaufen die afferenten Bahnen der Atemwege als pseudounipolare Neuronen mit dem Nervus vagus von den vagalen sensiblen Ganglien (Ganglion jugulare und Ganglion nodosum) bis in die Nuclei des Tractus solitarius. Zusätzlich wurde eine zweite Versorgung aus den thorakalen Spinalganglien nachgewiesen [35]. Pulmonale Afferenzen bedienen sich zur Informationsvermittlung ebenfalls der Tachykinine.

Man unterscheidet:

- Langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren, die in den Wänden der Bronchien und subpleural zu finden sind und den Hering-Breuer-Reflex, der die Einatmung als Schutz vor Überdehnung begrenzt, vermitteln,
- schnell adaptierende "Irritanzienrezeptoren", die vor allem in der Schleimhaut liegen, auf reizende Gase und mechanische Stimuli reagieren und z.B. den Hustenreflex vermitteln,
- C-Faser-Rezeptoren, die in Trachea, Bronchien und Lungenparenchym anzutreffen sind durch spezifische Stimuli wie Capsaicin (exogen), Bradykinin oder Histamin (endogen) und durch unspezifische Stimuli erregt werden [36, 37].

Erregungen sensorischer Neurone führen zu drei verschiedenen Wirkungen:

- zentrale Reflexe,
- eine Erregung sensorischer Kollateralen (die ihrerseits wiederum lokale Ganglienzellen aktivieren können),
- lokale Freisetzung von Neuropeptiden.

Da Neuropeptide auch die Aktivität und Chemotaxis von Immunzellen beeinflussen, kann eine Reizung von C-Fasern eine lokale Entzündung auslösen oder verstärken [38]. Dieses Phänomen wird als "neurogene Entzündung" bezeichnet.

Die Hyperreaktivität sensorischer Neurone beim Asthma ist mit einer Dysregulation des pulmonalen Neuropeptidhaushaltes in Zusammenhang gebracht worden [39]. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass es einerseits zu einer Hochregulation der Tachykininsynthese in sensorischen Neuronen kommt [40] und andererseits zu einer Charakterveränderung sensorischer Neurone im Ganglion nodosum. Das heißt im Rahmen der allergischen Entzündung werden Neuropeptide produziert, zu deren Expression die Nervenzellen zuvor nicht in der Lage waren [30]. Es wurde daher postuliert, dass ein Mehrangebot an exzitatorischen Neuropeptiden in den Atemwegen möglicherweise eine pathogenetische Rolle beim allergischen Asthma bronchiale spielen könnte [41]. Andere Studien zeigen jedoch, dass Tachykinin-Antagonisten keine signifikante klinische Wirkung bei Patienten

mit Asthma haben. Somit scheinen Neuropeptide nicht die führende Rolle in der Pathogenese der asthmatischen Atemwegsobstruktion zu spielen [42].

Jüngste Forschungen zeigen jedoch, dass möglicherweise die Blockade der Aktivierung sensorischer Neurone einen therapeutischen Effekt beim Asthma haben könnte. Die Aktivierung sensorischer Neurone geschieht unter anderem über sogenannte “Transient receptor potential“(TRP)-Kanäle. Wichtigste Vertreter dieser Rezeptorgattung sind der TRPV1-Rezeptor (der unter anderem durch Hitze oder Pfefferbestandteile aktiviert wird) und der TRPA1-Rezeptor (der unter anderem durch Kälte oder Prostaglandine oder Sauerstoffradikale aktiviert wird) [43]. In Tiermodellen des allergischen Asthma konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des TRPA1 (nicht jedoch des TRPV1) zu einer deutlichen Hemmung der Atemwegsentzündung und -obstruktion führt [44]. Klinische Studien zur Wirksamkeit von TRPA1-Antagonisten bei Patienten mit allergischem Asthma stehen noch aus.

1.2 Neurotrophine und Asthma

1.2.1 Neurotrophine

Der Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gehört zusammen mit dem NGF (Nerve growth factor) und den Neurotrophinen (NT) 3 und 4 zur Familie der Neurotrophine. Ihr Name geht zurück auf die ursprünglich beschriebene wesentliche Funktion als Wachstums- und Überlebensregulatoren von Neuronen (klassische Neurotrophinhypothese) [45]. Nach heutigem Erkenntnisstand trifft dies vor allem für die pränatale Periode zu. Während der Embryogenese werden Neurone im Überschuss angelegt. Es überleben jedoch nur jene, welche ihr spezifisches Innervationsziel in einem bestimmten Zeitrahmen erreichen und dort über Neurotrophin-Rezeptoren an ihrer Oberfläche mit den im Zielgebiet bereitgestellten Neurotrophinen (Target-derived neurotrophic factor) in Kontakt treten. Da diese dort nur in begrenzter Menge zur Verfügung stehen, kommt es zur Selektion: Bei Neuronen, denen ihre Ankunft im Zielgebiet nicht auf diese Weise signalisiert wird, tritt die Apoptose ein. Postnatal bestimmen Neurotrophine die funktionelle Differenzierung und Aktivität erwachsener Neurone im zentralen und peripheren Nervensystem [46].

Die Neurotrophinrezeptoren können in zwei Klassen unterteilt werden: Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Trk-Familie) sind hochaffin - TrkA für NGF, TrkB für BDNF und NT-4/5, sowie TrkC für NT-3. Der niedrigaffine Pan-Neurotrophinrezeptor p75NTR ist für alle Neurotrophine niedrigaffin, für deren Vorläuferproteine jedoch hochaffin [47, 48], und kann sehr verschiedene Wirkungen haben, die von bestimmten Begleitumständen abhängen [49].

Neurotrophinrezeptoren werden nicht nur von Zellen des Nervensystems exprimiert: p75NTR und die Trk-Rezeptoren finden sich ebenfalls auf der Oberfläche von Mastzellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten. Darüber hinaus produzieren die Zellen des Immunsystems auch selbst Neurotrophine und regen Neuronen zur verstärkten Expression von NGF und BDNF an. Umgekehrt beeinflusst beispielsweise NGF Mastzellen, Makrophagen, Eosinophile, B- und T- Zellen. Für BDNF konnte eine Beeinflussung des Migrationsverhaltens von Granulozyten und der Zytokinproduktion mononukleärer Zellen nachgewiesen werden [45, 50]. Die weite Verbreitung der Neurotrophin-Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems macht jedoch auch für BDNF eine Vielzahl von Wirkungen auf das Immunsystem wahrscheinlich.

1.2.2 BDNF

BDNF - ein basisches homodimeres Protein - besteht aus zwei 13,5 kDa schweren Untereinheiten, die aus Monomeren mit 119 Aminosäuren gebildet werden [51]. BDNF zeigt, neben NGF 3 als einziges weiteres Protein, eine 100%-Homologie der Aminosäuresequenz unter den Säugetieren und ist selbst mit denen niederer Wirbeltiere zu fast 90% übereinstimmend. Dies gibt einen Hinweis auf seine Unverzichtbarkeit für den Organismus [52].

Im adulten Gehirn kann eine hohe Expression von BDNF im Cortex cerebri, Cerebellum, Corpus amygdaloideum und in verschiedenen hypothalamischen Kernen beobachtet werden, die höchsten Werte findet man im Hippocampus [53, 54]. Die potentielle Rolle von BDNF in adultem viszeralem Gewebe sowie seine möglichen zellulären Quellen wurden in einer Mausstudie untersucht. Hier

ergaben sich signifikante Mengenunterschiede für BDNF in den unterschiedlichen Organen. So liegen in Harnblase, Lunge und Colon weit höhere BDNF-Level als in Hirn und Haut vor. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass BDNF-mRNA von viszerale Epithelzellen, Zellen der glatten Muskulatur und Neuronen des Plexus myentericus synthetisiert wird. Epithelien, die BDNF exprimieren, verfügen jedoch nicht über p75NTR und die Trk-Rezeptoren, welche hingegen auf den Neuronen des peripheren Nervensystems präsent sind. Die Daten erbringen den Nachweis, dass viszerale Epithelien eine Hauptquelle, nicht jedoch ein Zielgewebe für BDNF in den inneren Organen darstellen. Diese Studienergebnisse sind möglicherweise ein Hinweis darauf, dass das Neurotrophin einen regulatorischen Einfluss auf viszerale sensorische und motorische Neurone haben könnte [55].

Eine Besonderheit der BDNF-Physiologie, die sich bei keinem anderen Neurotrophin findet, ist die Speicherung von BDNF in Thrombozyten nach vorheriger Aufnahme aus externen Quellen. Es werden ca. 100 pg BDNF in 1 Million Thrombozyten gespeichert, dies entspricht einer Gesamtmenge von über 100 μ g thrombozytärem BDNF im zirkulierenden Blut des Menschen, welche mit der BDNF-Menge im ZNS durchaus vergleichbar ist [56, 57, 58, 59, 60]. Es wird vermutet, dass dieser riesige BDNF-Speicher die Freisetzung hoher Mengen an BDNF bei akutem Bedarf gewährleistet [61].

Aufgrund der Plättchendegranulation bei der Serum-Gewinnung sind beim Menschen hohe BDNF-Serumspiegel nachweisbar (1-50 ng BDNF/ml) . Hingegen sind die BDNF-Plasmaspiegel äußerst gering (< 100 pg BDNF/ml) [59]. Die BDNF-Serumspiegel können mit der Menge an BDNF im Gehirn korrelieren. Die Ursachen hierfür sind bislang unklar [62].

In der Lunge wird BDNF im respiratorischen Epithel stark und in der glatten Atemwegsmuskulatur und Gefäßmuskulatur schwach exprimiert. Die Rezeptoren (TrkB und p75NTR) finden sich nicht auf dem respiratorischen Epithel, sehr wohl aber auf den glatten Muskelzellen der Atemwege und der pulmonalen Gefäße [63]. BDNF wird eine wichtige Rolle bei der funktionellen Steuerung innervierender Neurone im respiratorischen Epithel und in der glatten Muskulatur und somit bei der Steuerung des cholinergen Atemwegstonus zugeschrieben [64]. Es wurden in den

letzten Jahren eine Reihe an Studien publiziert, die einen Zusammenhang zwischen BDNF und den funktionellen Veränderungen in den Atemwegen beim allergischen Asthma zeigen. Diese sollen im nächsten Kapitel dargelegt werden.

1.2.3 BDNF und Asthma

Studien zur Rolle von BDNF beim allergischen Asthma wurden zunächst im Tiermodell durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung die BDNF-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) erhöht ist, wobei interessanterweise die maximale BDNF-Konzentration bei Abklingen der Entzündungsreaktion nachgewiesen wurde. BDNF wird in den allergischen Atemwegen verstärkt durch entzündliche Infiltrate und Epithelien exprimiert [65]. Eine erhöhte BDNF-Konzentration in der BAL konnte auch beim Menschen mit allergischem Asthma nach Allergenprovokation nachgewiesen werden [16]. BDNF wird von verschiedenen Immunzellen, vor allem Makrophagen und Monozyten, freigesetzt [66]. Diese BDNF-Sekretion kann durch Entzündungsmediatoren wie Interleukin-6 oder TNF-Alpha gesteigert werden [66]. Inhalative Corticosteroide senken hingegen die BDNF-Produktion durch Immunzellen [67] und die BDNF-Serumspiegel. [68] Bei Patienten mit allergischem Asthma finden sich auch systemisch erhöhte BDNF-Konzentrationen in Serum und Thrombozyten. Interessanterweise korrelieren diese Spiegel mit der Atemwegsobstruktion und der bronchialen Hyperreagibilität der Patienten (Abbildung 1.3) [67].

Die genaue Ursache des Zusammenhangs zwischen erhöhten systemischen BDNF-Spiegeln und der bronchialen Hyperreagibilität beim allergischen Asthma ist bislang nicht bekannt. Gegenwärtige Hypothesen gehen davon aus, dass BDNF durch funktionelle Veränderungen der Atemwegsneurone die Reagibilität der Atemwege beeinflusst. Ob die erhöhten systemischen Spiegel ein Abbild der lokalen BDNF-Erhöhung in der Lunge sind, oder eine genuine pathophysiologische Rolle der (BDNF-überladenen) Monozyten widerspiegeln, ist jedoch noch unbekannt.

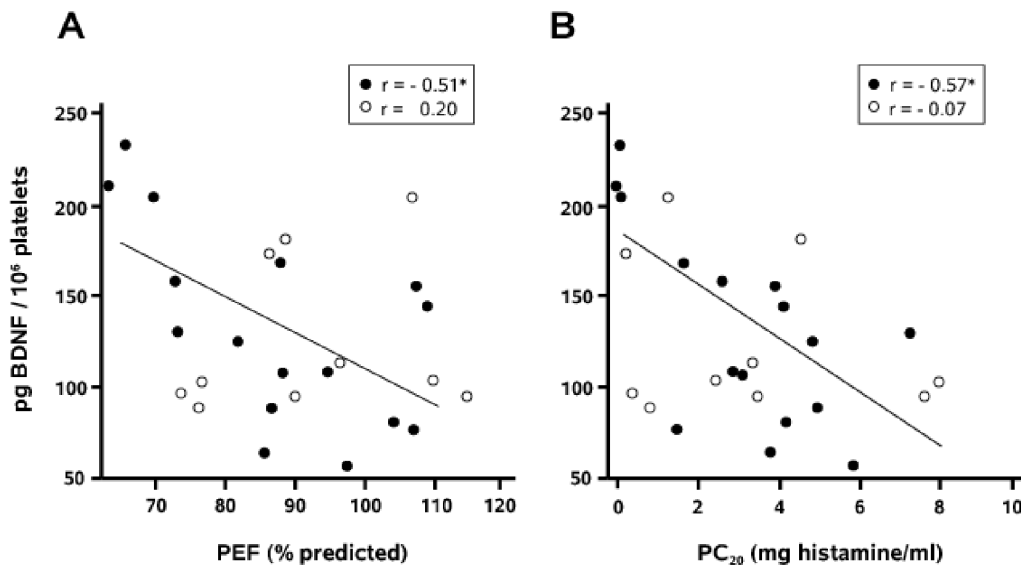


Abbildung 1.3: Korrelation zwischen BDNF-Thrombozytenbeladung und Lungenfunktion. Gezeigt werden die Korrelationen zwischen BDNF in Thrombozyten und dem PEF (Peak expiratory flow) bzw. der PC₂₀ (Histaminkonzentration, die zu einem 20%-Abfall der FEV₁ führt, ein Marker der bronchialen Hyperreagibilität) von 20 Patienten mit Asthma bronchiale. Schwarze Kreise kennzeichnen steroidnaive Patienten, farblose Kreise Patienten mit inhalativer Steroidmedikation. Die Korrelationen wurden mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r) berechnet. Signifikant negativ korreliert der BDNF-Gehalt der Thrombozyten sowohl mit dem Peak flow als auch der PC₂₀ (jeweils mit einem Stern markiert). Die Geraden stellen die Regressionsgerade der steroidnaiven Patienten dar (*entnommen aus [67]*).

1.3 Inhalative Beta2-Sympathomimetika in der Asthmatherapie

In den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts kamen mit Orciprenalin und Isoprenalin die ersten inhalativen Sympathomimetika für die Therapie des Asthma bronchiale auf den Markt (siehe Tabelle 1.1). Diese sind strukturell vom Noradrenalin abgeleitet, dessen Wirkung sie direkt, das heißt an den Adrenorezeptoren, imitieren [69]. Inman et al. zeigten 1969 einen signifikanten Anstieg der Mortalität bei Asthma in Relation zur steigenden Verordnung dieser Aerosole (Abbildung 1.4). Dieses Phänomen wurde damals auf kardiale Nebenwirkungen der unspezifisch sympathomimetischen Wirkung der Medikamente zurückgeführt.

Beta-Mimetika	Kurzbezeichnung	Wirkdauer	Wirkstoffe	Beispiel Handelsnamen
nicht selektive Beta-Mimetika		6 h	Orciprenalin	Alupent
			Isoprenalin	nicht mehr im Handel
kurz wirksame Beta2-Mimetika	SABA	4-6 h	Salbutamol	Sultanol
			Fenoterol	Berotec
			Terbutalin	Aerodur
			Reproterol	Bronchospasmin
lang wirksame Beta2-Mimetika	LABA	12 h	Salmeterol	Serevent
			Formoterol	Foradil
ultralang wirksame Beta2-Mimetika	VLABA	24 h	Olodaterol	in Entwicklung
			Vilanterol	in Entwicklung
			Indacaterol	Onbrez *
			Carmoterol	in Entwicklung
			Arfometerol	in Entwicklung

Tabelle 1.1: Beta-Mimetika in der Therapie obstruktiver Atemwegserkrankungen (* *nur zur Therapie der COPD zugelassen*). SABA: short acting beta-agonist, LABA: long acting beta-agonist, VLABA: very long acting beta-agonist.

Es zeigte sich jedoch Ende der 1970er Jahre, dass es auch einen Zusammenhang zwischen erhöhter Mortalität und spezifischen (kurzwirksamen) Beta-Mimetika („short acting beta-agonist“ SABA) gibt [70]. Dazu passend konnte gezeigt werden, dass die Fenoterol-Dauertherapie riskanter war als die Fenoterol-Bedarfstherapie [71]. Ähnliches wurde für das SABA Terbutalin gezeigt [72]. Als mögliche Ursache der Mortalitätssteigerung unter inhalativen Beta2-Mimetika wurde eine paradoxe Steigerung der bronchialen Hyperreagibilität diskutiert [73].

Mit der Einführung der neuen langwirksamen Beta2-Mimetika (LABA) Anfang der 1990er Jahre keimte Hoffnung auf, dass die bislang beobachteten Nebenwirkungen bei Asthma nicht mehr auftreten würden. Diese Hoffnung erfüllte sich nicht. Castle et al. veröffentlichten 1993 eine klinische Studie, die die Mortalität von Patienten mit Asthma bronchiale unter regelmäßiger Inhalation von Salmeterol („long acting beta-agonist“ LABA) und Salbutamol (SABA) verglich. Es zeigte sich eine erhöhte Mortalität unter Salmeterol-Therapie im Vergleich zur Salbutamol-Therapie [74]. In der daraufhin durchgeführten Studie, bei der eine Salmeterol-Monotherapie mit

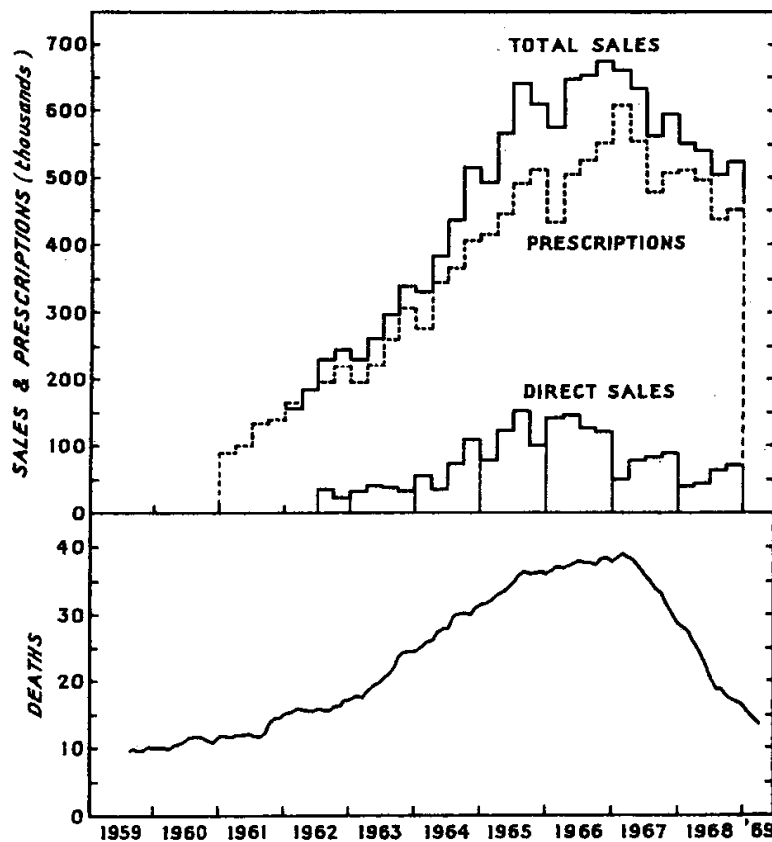


Abbildung 1.4: Mortalität und Verordnung von inhalativen Beta-Mimetika (entnommen aus [69])

Placebo-Therapie verglichen wurde, bestätigte sich die erhöhte Mortalitätsrate unter Salmeterol-Therapie [75]. Für Formoterol wurden kürzlich ähnliche Daten publiziert [76].

Für die aktuell neu entwickelten ultralang wirksamen Beta2-Mimetika (“very long acting beta-agonist“, VLABA) liegen bislang keine Daten bezüglich Asthma bronchiale vor. Es ist jedoch aufgrund der umfangreichen Daten zu SABA und LABA davon auszugehen, dass es sich bei der Mortalitätszunahme unter Beta2-Mimetika um einen generellen Effekt dieser Medikamentenklasse handelt.

Man geht bislang davon aus, dass vor allem die Monotherapie mit Beta2-Mimetika beim Asthma risikobehaftet ist. Aus der gegenwärtigen Datenlage lässt sich jedoch nicht mit hundertprozentiger Sicherheit beweisen, dass eine Kombination mit inhalativen Corticosteroiden immer sicher ist. Daher äußert sich die FDA (

“US Food and Drug Administration“, US-amerikanische Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit) auch zurückhaltend gegenüber der Kombination und empfiehlt wenn möglich eine ICS-Monotherapie (Abbildung 1.5).

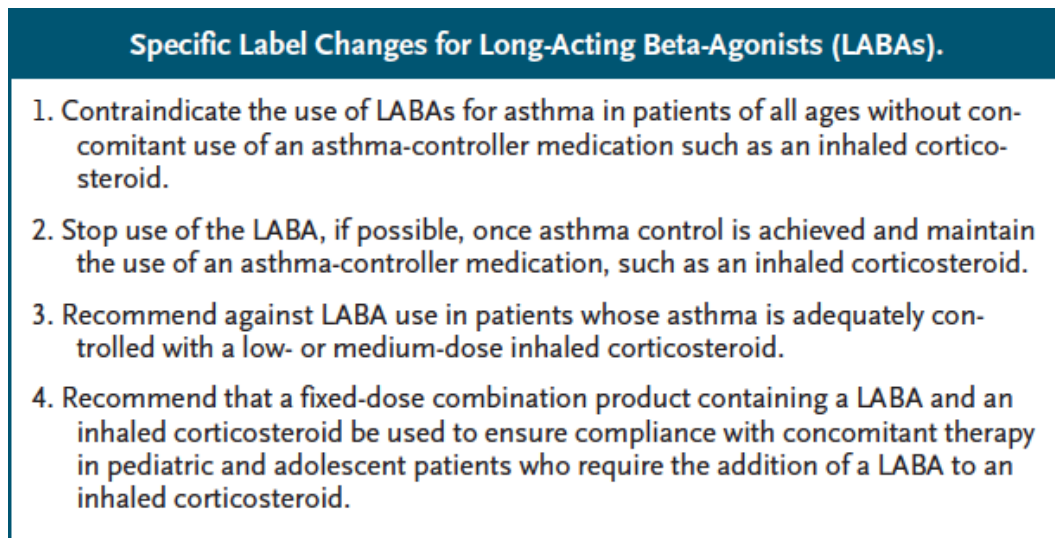


Abbildung 1.5: Empfehlung der FDA 2010 zur Asthmatherapie mit LABAs [77]

Der Mechanismus der negativen Effekte der Beta2-Mimetika auf die Asthmakontrolle ist bislang unklar. Wie bereits erwähnt, wurde eine paradoxe Erhöhung der bronchialen Hyperreagibilität für den Verlust an der Asthmakontrolle verantwortlich gemacht. Die Ursache dieses Phänomens war bislang jedoch nicht bekannt.

Kürzlich konnte in einer in vitro-Studie gezeigt werden, dass Salmeterol die Sekretion von BDNF in Zellkulturen humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes steigert [78] (Abbildung 1.6). Somit wurde BDNF erstmals als ein mögliches Bindeglied zwischen Beta2-Mimetika-Therapie und veränderter bronchialer Hyperreagibilität beschrieben. In vivo-Daten lagen aber bislang nicht vor.

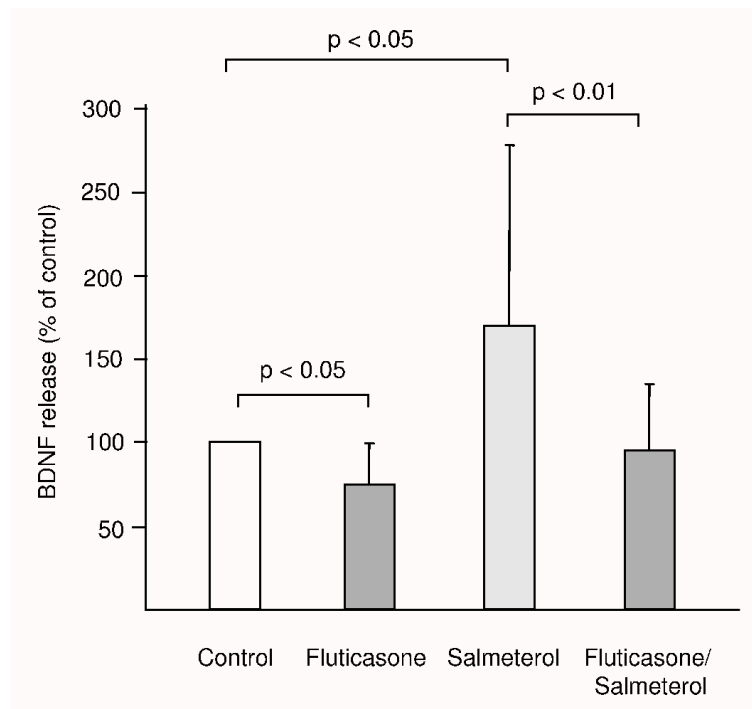


Abbildung 1.6: In Vitro-Freisetzung von BDNF aus Leukozyten. Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von 22 gesunden Probanden wurden für 24 h mit 50 ng/ml TNF-Alpha stimuliert. Gezeigt werden hier die BDNF-Konzentrationen in Zellkulturüberständen nach Stimulation mit Fluticason Propionat (10^{-7} M), Salmeterol Xinafoat(10^{-7} M) und beiden Substanzen (Fluticason Propionat 10^{-7} M und Salmeterol Xinafoat 10^{-7} M) im Vergleich zur Kontrolle (*entnommen aus [78]*).

1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, den Einfluss von Salmeterol auf die BDNF-Spiegel und die bronchiale Hyperreagibilität von Patienten mit allergischem Asthma in vivo zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde ein Studiendesign entworfen, welches zunächst eine Therapie mit Salmeterol (über zwei Wochen) und dann eine (ebenfalls zweiwöchige) Therapie mit Salmeterol / Fluticason beinhaltete. Durch sequentielle Messung der BDNF-Spiegel und der bronchialen Hyperreagibilität (gegenüber Histamin) sollte der Einfluss der Monotherapie und der Kombinationstherapie in vivo untersucht werden.

Kapitel 2

Methoden

2.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Die Patienten wurden über eine Zeitungsannonce in der Ostseezeitung (Rostocker Ausgabe) rekrutiert (Abbildung 2.1).

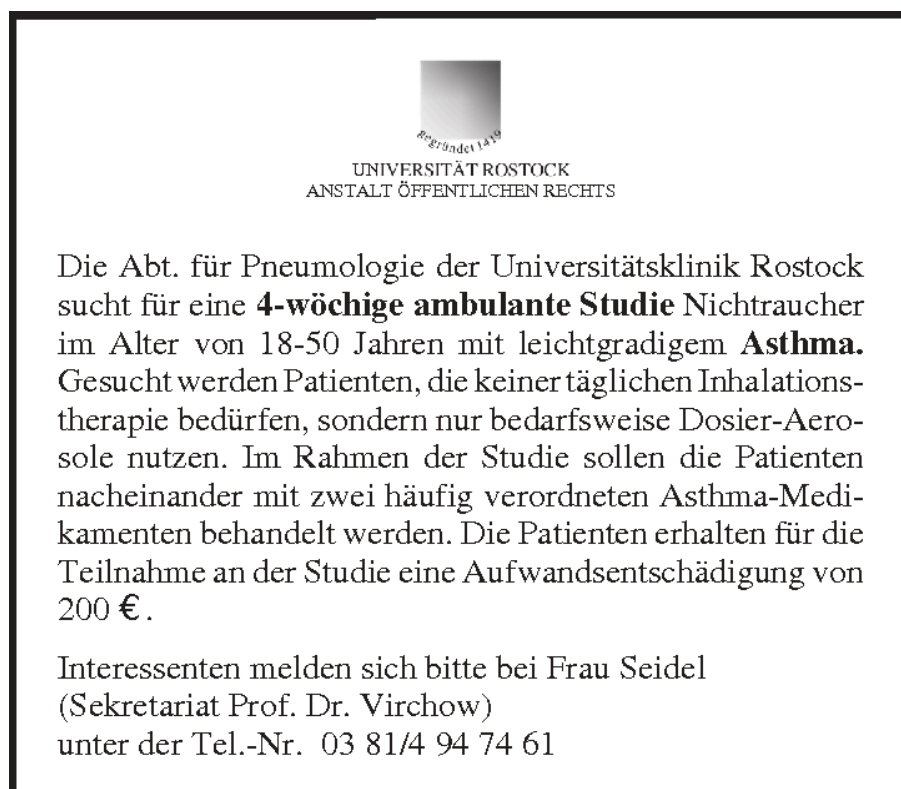


Abbildung 2.1: Studienanzeige in der Rostocker Ostseezeitung

Rekrutierungskriterien waren:

1. Alter 18 - 50 Jahre
2. die durch einen Arzt gestellte Diagnose eines Asthma bronchiale
3. Nichtraucherstatus
4. die ausschließliche Bedarfsmedikation mit einem inhalativen kurzwirksamen Beta2-Sympathomimetikum

Patienten, die die Rekrutierungskriterien erfüllten, wurden in der Pneumologischen Abteilung der Inneren Medizin der Universität Rostock einer Bodyplethysmographie sowie Bestimmung der PC_{20} gegenüber Histamin unterzogen. Für die Studie bestanden folgende Einschlusskriterien:

1. $FEV_1 > 80\%$ ohne vorherige Inhalation eines Bronchodilatators
2. bronchiale Hyperreagibilität ($PC_{20} < 8$ mg/ml Histamin)
3. anamnestisch das Vorliegen einer Allergie (Pollen, Tierhaare, Hausstaubmilben)

Ausschlusskriterien waren:

1. jede Art von chronischer Erkrankung (außer Asthma)
2. Symptome einer akuten Infektion
3. Zigarettenrauchen in der Anamnese

2.2 Studiendesign

Bei Vorliegen aller Rekrutierungs- und Einschlusskriterien und Nichtvorliegen aller Ausschlusskriterien wurden die Patienten über Inhalt und Durchführung der Studie aufgeklärt sowie nach Unterzeichnung der Aufklärung sowie der Einverständniserklärung in die Studie eingeschlossen. Die Studie wurde im Vorfeld der Untersuchungen durch die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock begutachtet. Es wurden keine Bedenken bezüglich der Studie geäußert.

Die Teilnehmer füllten einen Fragebogen zur Erfassung der Anamnese aus. Daraufhin erfolgte die erste venöse Blutentnahme aus der Ellenbeuge und die Patienten wurden in der Handhabung des Inhalationsgerätes (Discus) und des Peakflowmeters instruiert.

In den folgenden zwei Wochen, sollte täglich zweimal morgens und abends Salmeterol Xinafoat 50 μg (Serevent Discus ©, GlaxoSmithKline, GSK, Brentford, UK) inhaliert werden. Zusätzlich war aus Sicherheitsgründen eine tägliche Kontrolle und Dokumentierung des expiratorischen Peak Flow durchzuführen. Bei einem Abfall unter 3 l/s und/oder deutlicher Verschlechterung der Atemnotsymptomatik sollte der Studienleiter informiert werden. Auch waren die Patienten angehalten, die Häufigkeit der Asthmaanfälle in diesen 14 Tagen und die Menge der benötigten Hübe ihrer gewohnten Bedarfsmedikation zu protokollieren.

Im Anschluss an diese erste Phase erfolgte an Tag 15 eine erneute Lungenfunktionsmessung und Bodyplethysmographie auf der Pneumologischen Station, sowie die zweite Blutprobenentnahme und eine eingehende Befragung zur veränderten Symptomatik und eine Sichtung des vom Patienten geführten Protokolls. Am Morgen dieses Tages durfte keine Inhalation mit Serevent erfolgen.

Die zweite Studienphase schloss sich an die Bodyplethysmographie an Tag 15 an. Die Patienten begannen direkt nach der Messung mit der Inhalation des Kombinationspräparates aus Salmeterol Xinafoat 50 μg und Fluticason Propriolat 250 μg (Viani Discus ©, GSK), welche wiederum täglich zweimal morgens und abends für 14 Tage durchzuführen war. Ebenso wurde die Protokollierung zu Symptomatik und Peak Flow durch die Patienten fortgeführt.

An Tag 29 wurden die Patienten ein letztes Mal zur Bodyplethysmographie und Blutentnahme einbestellt. An diesem Morgen erfolgte wiederum keine Inhalation von Viani mehr. Die Protokolle zur Anfallshäufigkeit und zum Peak Flow wurden einbehalten. Nach Bestätigung des Wohlbefindens durch die Patienten konnten diese entlassen werden (Abbildung 2.2).

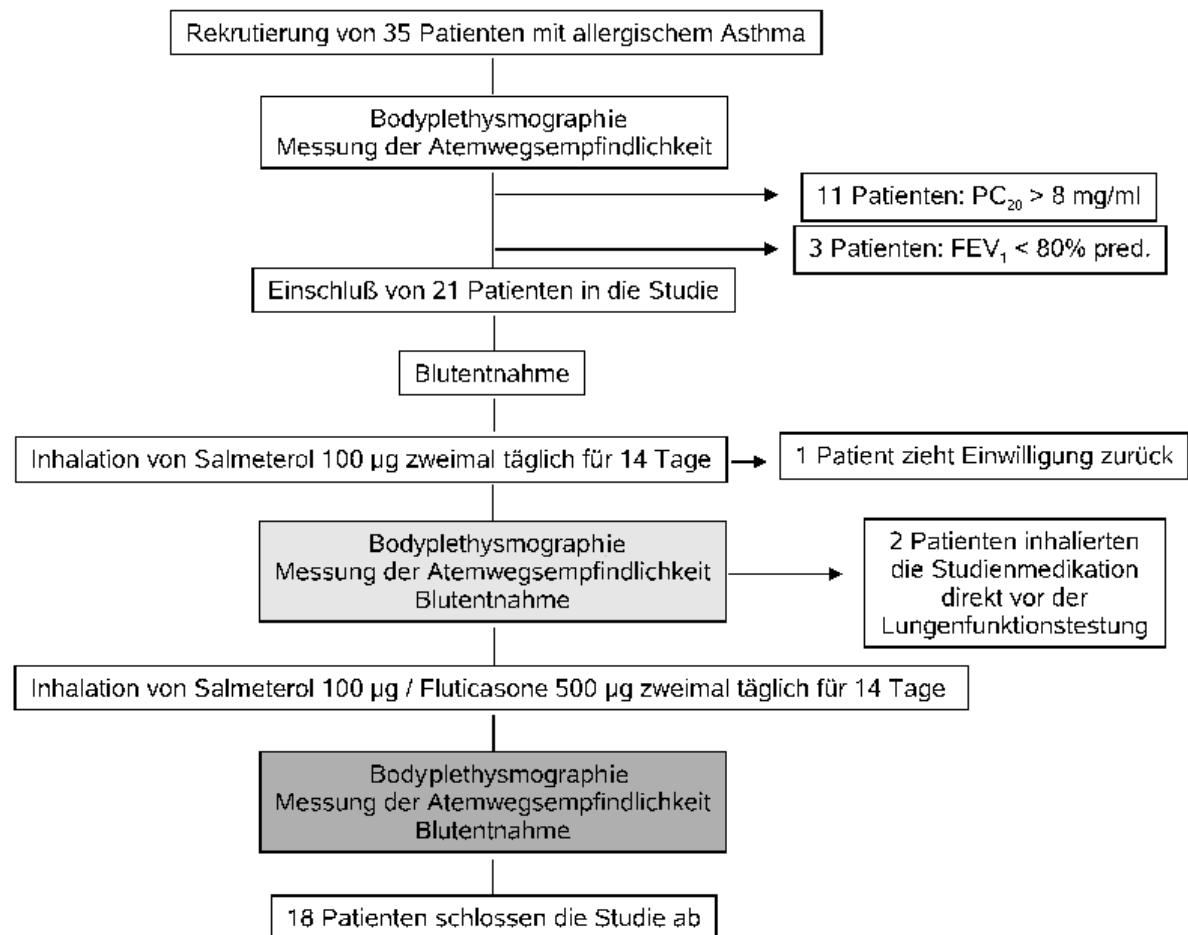


Abbildung 2.2: Studienablauf

2.3 Gewinnung und Verarbeitung der Blutproben

Material

Stauschlauch

Hautdesinfektion mit Neokodan

Sterile Wattetupfer

Monovette-Kanüle 0,8 x 38mm [Sarstedt, Nümbrecht, D]

Monovette EDTA 2,7 ml [Sarstedt, Nümbrecht, D]

Monovette Li-Heparin 2,7 ml [Sarstedt, Nümbrecht, D]

Monovette Serum 2,7 ml [Sarstedt Nümbrecht, D]

Zu Beginn der Studie wurden 6 Röhrchen, zu jedem weiteren Zeitpunkt 5 Röhrchen abgenommen:

1. ein kleines EDTA-Röhrchen (zur Blutbildbestimmung) beziehungsweise bei der ersten Blutentnahme ein weiteres kleines EDTA-Röhrchen (zur Bestimmung des Beta-Rezeptor-Polymorphismus),
2. zwei kleine Röhrchen ohne Additiva (zur Serumgewinnung),
3. zwei kleine heparinisierte Röhrchen (zur Plasmagewinnung).

Sofort nach der Abnahme wurden die Plasma-Röhrchen bis zur Weiterverarbeitung für 60 Minuten auf Eis gelegt. Die Serum-Röhrchen wurden 60 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Danach erfolgte die gemeinsame Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 G und 4°C (Megafuge 1,0 R; Kendro-Heraeus, Stuttgart, D). Die jeweiligen Überstände (Serum und Plasma) wurden aliquotiert und anschließend in Eppendorf-Röhrchen (Fa. Eppendorf, Hamburg, D) bei –80°C tiefgefroren.

Die EDTA-Röhrchen wurden zur Blutbildbestimmung in das Institut für Klinische Chemie und Labormedizin der Universität Rostock gegeben.

2.4 Bodyplethysmographie

Material

Ganzkörperbodyplethysmograph mit Auswertungssoftware [Fa. Jaeger, Würzburg, D]

Mundstück und Nasenklemme [Fa. Jaeger, Würzburg, D]

2 Histamin-Stammlösungen in 0,9% Natriumchlorid in den Konzentrationen 4 mg/ml und 32 mg/ml [Fa. Fagron]

0,9% Natriumchlorid zur Verdünnung [Mallincrodt-Baker, Deventer, NL]

Pari-Inhalierboy [Pari-Werk GmbH, Starnberg, D]

Lungenfunktionsprüfung

Diese Methode erlaubt mit großer Sensitivität eine Bestimmung des Atemwegswiderstandes und statischer Lungenvolumina (inklusive der Residualkapazität und der totalen Lungenkapazität) in einer mitarbeitsunabhängigen Weise und stellt

gegenwärtig die umfassendste Methode zur Erfassung der Lungenfunktion dar. Die Methode beruht auf der Gesetzmässigkeit, dass das Produkt aus Druck und Volumen konstant ist, weshalb aus Druckänderungen auf das intrathorakale Gasvolumen geschlossen werden kann. Dabei sitzt der Patient in einer geschlossenen Kabine (Abbildung 2.3). Für die Messung der Atemstromstärke ist der Patient an einen Pneumotachographen (über Mundstück) angeschlossen. Durch die Änderung seines Körpervolumens während der Atmung kommt es zu Druckveränderungen in der Kammer, die aufgezeichnet werden. Man erhält ein Druck-Strömungsdiagramm, welches über das Verhalten des Strömungswiderstandes während eines gesamten Atemzyklusses exaktere Aussagen erlaubt, als es mit den sonstigen Methoden möglich ist. Teil der bodyplethysmographischen Messungen ist auch eine einfache Spirometrie. Mit dieser Methode werden die mobilisierbaren Lungenvolumina (z.B. die forcierte expiratorisch Vitalkapazität in der ersten Sekunde, FEV_1) und die Strömungsgeschwindigkeiten (z.B. der Peak Flow, die maximale Atemstromgeschwindigkeit bei der Ausatmung) erfasst. Die Methode der Bodyplethysmographie erlaubt somit eine umfassende Bestandsaufnahme der statischen und mobilisierbaren Lungenvolumina des Menschen.



Abbildung 2.3: Ganzkörperplethysmograph der Fa. Jäger

Der Patient sitzt aufrecht in der ca. 1 m^3 großen Kabine des Ganzkörperplethysmographen. Dann wird er mit dem Pneumotachographen verbunden und die Nase wird mit Hilfe einer Nasenklemme verschlossen. Nach Schließen der Tür des Ganzkörperplethysmographen sollte einige Minuten gewartet werden, um die sich nun erwärmende Luft im Ganzkörperplethysmographen, welche zu einer Drift des Signals führt, zu kompensieren. Dank der Software moderner Ganzkörperplethysmographen ist eine schnelle Drift-Kompensation möglich, so dass nur eine kurze Wartezeit bis zum Beginn der Messung notwendig ist. Der Patient wird aufgefordert, ruhig ein- und auszuatmen. Es erfolgt zuerst die Bestimmung des Atemwegswiderstandes bei Ruheatmung. Erreicht der Patient die endexpiratorische Atemruhelage wird das Atemrohr verschlossen. Der Patient wird nun aufgefordert, gegen den bestehenden Widerstand ruhig einzuatmen. Durch dieses Manöver kann das intrathorakale Gasvolumen berechnet werden. An dieses Manöver schließt sich dann die Bestimmung der Atemvolumina (Spirometrie) an. Hierbei wird der Patient aufgefordert, zunächst maximal auszuatmen, dann maximal einzuatmen und dann so schnell wie möglich vollständig auszuatmen. Mit der nachfolgenden Einatmung ist die Messung beendet, und der Proband kann aus der Kabine entlassen werden.

Messung der bronchialen Reagibilität auf Histamin

Der unspezifische bronchiale Provokationstest dient der Bestimmung der Reaktivität der Atemwege auf unspezifische, nichtsensibilisierende Reize. Er dient in erster Linie der Abklärung von Husten unklarer Ätiologie oder unklarer Dyspnoe sowie zur Objektivierung des Schweregrades eines Asthma bronchiale. Es werden in der Klinik unterschiedliche Reizstoffe verwendet. Wir haben uns in dieser Studie für Histamin entschieden, da Histamin vor allem neuronale Strukturen der Atemwege stimuliert. Vor der Provokation wurde bei allen Patienten die Ausgangs-Lungenfunktion nach Inhalation einer 0,9%igen Natriumchloridlösung bestimmt, auch um zu gewährleisten, dass diese nicht schon von vornherein eingeschränkt war (Kontraindikation: Tiffeneau-Index $< 70\%$) bzw. um sicher zu stellen, dass eine Provokation der Bronchien aus ärztlicher Sicht überhaupt vertretbar war. Im Anschluss an die Lungenfunktionsprüfung wurden die Patienten gebeten, eine Minute lang eine 0,4 mg/ml-Histamin-Natriumchlorid-Lösung mittels PARI-BOY zu inhalieren. Danach wurde erneut die Lungenfunktion gemessen und mit der ersten Messung verglichen. Kam es nach der ersten Histaminprovokation zu keinem signifikantem Abfall der Lungen-

funktion (Abfall der FEV_1 um weniger als 20%), so setzten die Patienten die einminütigen Inhalationen mit höher konzentrierten Histamin-Natriumchlorid-Lösung fort bis ein Abfall der FEV_1 um 20% erreicht wurde. Die Lungenfunktionsmessung erfolgte nach jeder weiteren Inhalation (Abbildung 2.4). Es standen insgesamt fünf Histamin-Natriumchlorid-Lösungen in den Konzentrationen 0,4, 2, 4, 8 und 32 mg/ml zur Verfügung. Alle Lösungen wurden am jeweiligen Untersuchungstag unmittelbar vor Eintreffen der Studienteilnehmer frisch aus den beiden Stammlösungen hergestellt.

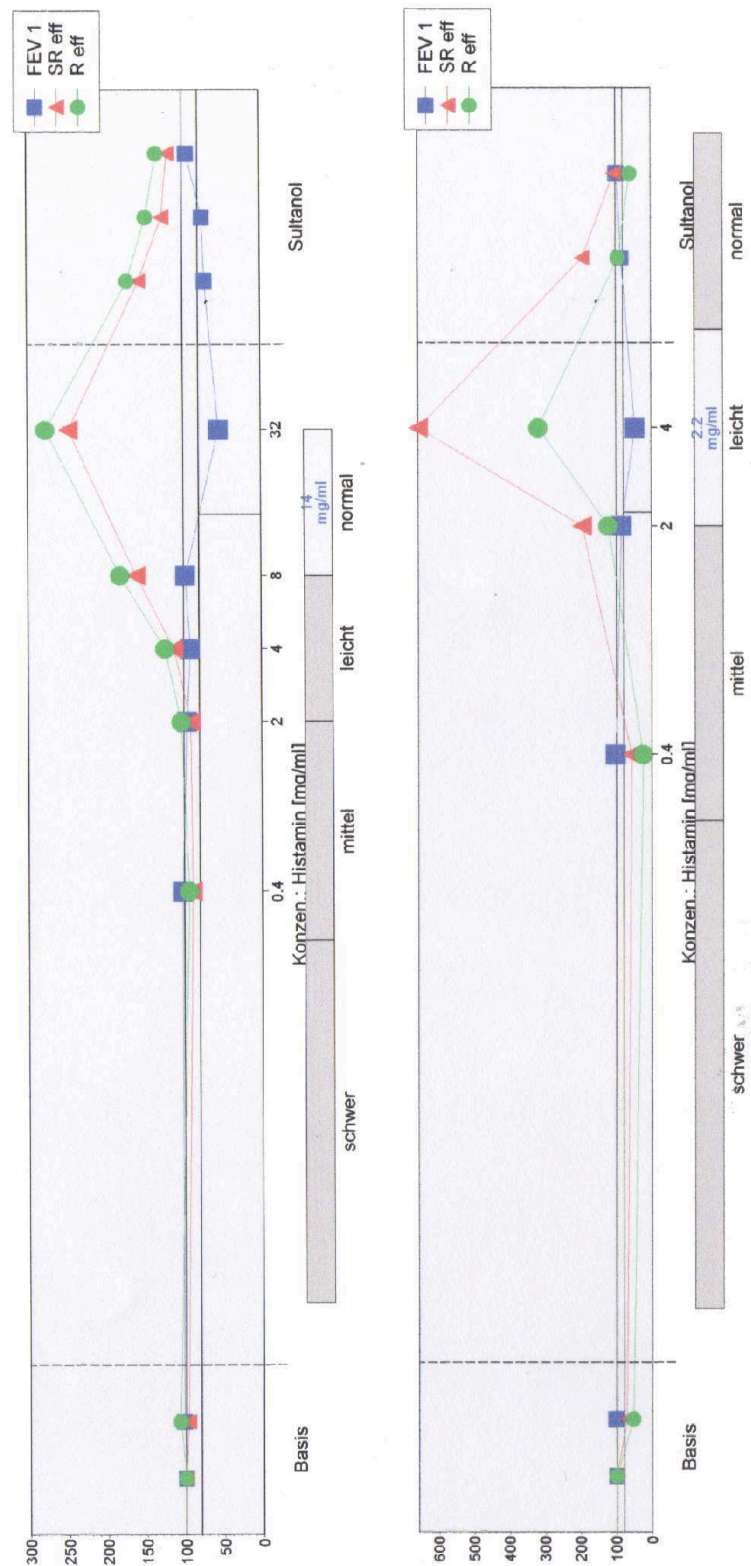


Abbildung 2.4: Messung der Atemwegsreagibilität mittels Histaminprovokation. Gezeigt werden links die Reaktion eines Gesunden (Abfall der FEV₁ um >20% erst nach Inhalation von 32 mg/ml Histamin) und rechts die Reaktion eines Patienten mit allergischem Asthma (Abfall der FEV₁ um >20% nach Inhalation von 4 mg/ml Histamin)

2.5 ELISA

Geräte und Materialien

Multichannel-Pipette [Eppendorf, Hamburg, D]
 Pipette Research 100 - 1000 μl [Eppendorf, Hamburg, D]
 Pipette Research 20 - 200 μl [Eppendorf, Hamburg, D]
 Waschautomat Amerlite Washer [Amersham Buchler, Braunschweig, D]
 Photometer Anthos ht III [Anthos Mikrosysteme, Krefeld, D]
 Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R [Kendro Laboratory Products, Hanau, D]
 Schüttler The Belly Dancer [Stovall Life Science, Greensboro, USA]
 Rundbodenplatten, 96 Wells [Greiner microlon, Frickenhausen, D]
 Pipettenspitzen blau 1000 μl [Greiner BioOne, Frickenhausen, D]
 Pipettenspitzen gelb 200 μl [Greiner BioOne, Frickenhausen, D]
 PP - Röhrchen 1,3 ml [Greiner BioOne, Frickenhausen, D]
 Reagent Reservoir Costar 50 ml [Corning Life Sciences, Wiesbaden, D]
 ELISA-Kit DuoSet [R&D Systems, Wiesbaden, D]
 Bovines Serumalbumin [BSA] [Sigma, Deisenhofen, D]
 Tween 20 [Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D]
 Entwickler [R&D Systems, Wiesbaden, D]
 Color Reagent A: H_2O_2 ; Color Reagent B: Tetramethylbenzidin

Lösungen

10 x PBS: 160,2 g NaCl + 28,8 g Na_2HPO_4 + 4,03 g KCL + 4,08 g KH_2PO_4
 aufgelöst in 2000 ml Aqua dest.
 pH-Wert eingestellt auf 7,3; zum Gebrauch 1:10 verdünnt
 Blockpuffer: PBS + 1 % BSA + 5 % Saccharose + 0,05 % NaN_3
 Reagent Diluent: PBS + 1 % BSA
 Waschpuffer: PBS + 0,05 % Tween 20
 Stopp-Lösung: 2N H_2SO_4

Methode

Der so genannte "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) dient der quantitativen Bestimmung von Protein-Stoffmengenkonzentrationen. Die Bildung

eines Komplexes aus gesuchtem Eiweiß, Antikörpern und einem Enzym führt zur enzymatischen Umsetzung eines Substratgemisches. Hiermit ist ein Farbumschlag verbunden, der sich photometrisch bestimmen und in die Konzentration des interessierenden Proteins umrechnen lässt.

Der Ablauf wird im Folgenden beschrieben und in Abbildung 2.5 dargestellt: Der auf die Mikrotiterplatte aufgetragene monoklonale Primärantikörper (Capture Antibody) wird an diese fest gebunden [1]. Wird nun die Probe mit dem interessierenden Protein (Antigen) dazu gegeben, bindet der Primärantikörper dieses ebenfalls [2]. Der im Folgenden hinzugefügte polyklonale Sekundärantikörper (Detection Antibody) bindet mit einer seiner zwei Bindungsstellen ebenfalls an diesen Antigen-Antikörper-Komplex [3]. Die andere Bindungsregion fixiert die nun dazukommende Streptavidin-Peroxidase [4], welche in der Lage ist, Tetramethylbenzidin durch eine Redoxreaktion mit Wasserstoffperoxid in die oxidierte Form zu überführen und somit einen bläulich sichtbaren Farbumschlag bewirkt [5]. Die Zugabe von Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag in den gelblichen Bereich [6], welcher in seiner Intensität quantitativ bestimmt werden kann und mit Hilfe der mitgeführten Standardreihen definierter Konzentrationen in die Stoffmengenkonzentration des gesuchten Proteins umgerechnet werden kann.

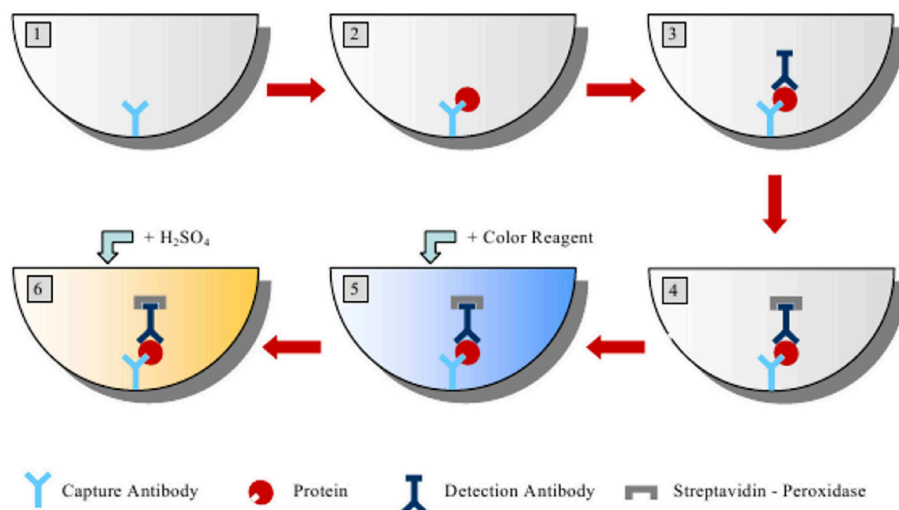


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips. *angepasst aus [79]*

Durchführung

Die Primärantikörper wurden in PBS auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und mit jeweils 50 μ l pro Well auf die ELISA-Platte aufgetragen. Die mit Parafilm abgedeckten Platten wurden in Dunkelheit bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten mit Hilfe des Waschautomaten fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Der hierfür verwendete Puffer wurde vor jeder Benutzung frisch angesetzt. Im Anschluss daran erfolgte das Auftragen von 100 μ l Blockpuffer pro Well; die Platten wurden daraufhin bei Dunkelheit und Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert und wiederum fünfmal gewaschen. Nach dem im Folgenden beschriebenen Schema wurde nun das Pipettieren der Probenlösungen vorgenommen: In die beiden oberen Reihen der Platte wurden in die ersten zehn Wells 50 μ l der Standardverdünnungsreihen pipettiert; die beiden letzten Vertiefungen enthielten lediglich 50 μ l Verdünnungslösung und dienten als Negativkontrolle und Blankwert. Die übrigen 72 Wells in den unteren sechs Reihen der Platte wurden durch jeweils 50 μ l der Probenlösungen belegt. Die Proteinkonzentrationen aller Proben wurden in Doppelbestimmung erfasst. Die Platten wurden mit Parafilm abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen wurden pro Well 50 μ l des Sekundärantikörpers aufgetragen und mit Parafilm abgedeckt, um dann für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer zu inkubieren, wonach die Platten dann wiederum fünfmal gewaschen wurden. Im Folgenden wurde dann die Meerrettich-Peroxidase-Stammlösung 1:200 mit Reagent Diluent verdünnt und mit einem Volumen von 50 μ l pro Well appliziert. Daran schloss sich eine Inkubation bei Dunkelheit und Raumtemperatur von 20 Minuten Dauer an. Die im Verhältnis 1:1 gemischten Color Reagents A und B wurden nun mit einem Volumen von 50 μ l pro Well auf die Platten aufgetragen und bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Nach ca. 20 Minuten wurden 50 μ l der 1 M Schwefelsäure zum Abstoppen der Reaktion hinzu gegeben. Es erfolgte die sofortige Messung der optischen Dichten mit Hilfe des Anthos HT3 Readers bei 450 nm Wellenlänge und einem Referenzfilter bei 595 nm. Unter Verwendung der mitgeführten Standardreihen erfolgte die computergestützte Umrechnung der optischen Dichten in die entsprechenden Konzentrationen.

Für die Messung von BDNF im Serum wurde Serum 1:50 in PBS verdünnt.

Das Detektionslimit betrug 8 pg/ml.

2.6 Bestimmung des Beta2-Rezeptor-Polymorphismus

Zur Analyse des Polymorphismus des Beta2-Rezeptors wurden die bei der ersten Blutentnahme gewonnenen EDTA-Röhrchen aller Patienten in das kommerzielle Labor IMG M Laboratories (www.imgm.com) nach Martinsried (Deutschland) gesandt. Bestimmt wurden zum einen der arg16gly-Polymorphismus (Homozygotie für Glycin oder Homozygotie für Arginin oder Heterozygotie) und zum anderen der gln27glu-Polymorphismus (Homozygotie für Glutamin oder Homozygotie für Glutaminsäure oder Heterozygotie).

2.7 Statistik

Die Daten wurden mittels SPSS (Chicago, IL, USA) analysiert. Die meisten Parameter waren nicht normal verteilt. Deshalb wurden die Korrelationsanalysen mit dem Spearman-Korrelations-Koeffizienten durchgeführt. Die Lungenfunktionsparameter und die BDNF-Konzentrationen der verschiedenen Zeitpunkte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für verbundene Stichproben verglichen. Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Von den 35 rekrutierten Patienten erfüllten 14 die Einschlusskriterien nicht (n=11 hatten eine PC₂₀ von >8 mg/ml und n=3 hatten eine FEV₁ < 80% vom Soll). Daher wurden 21 Patienten in die Studie eingeschlossen (siehe Abbildung 2.2). Von den 21 in die Studie eingeschlossenen Patienten brach ein Patient die Studie während der Phase der Salmeterolinhalationen aufgrund einer subjektiven Zunahme der Asthmasymptome ab. Zwei Weitere inhalierten irrtümlicherweise die Studienmedikation am Morgen vor der zweiten Lungenfunktionsmessung und wurden daher aus der Studie ausgeschlossen. Somit beendeten insgesamt 18 Patienten die Studie. Ihre Charakteristika sind in Tabelle 3.1 zusammengestellt. Geringgradige Nebenwirkungen der Salmeterol-Monotherapie wie subjektives Unwohlsein oder eine Zunahme der Dyspnoe wurden von drei der Patienten berichtet, diese führten jedoch nicht zum Abbruch der Studie. Keiner der Patienten beklagte diese Beschwerden unter der Kombinationstherapie. Stärkere Nebenwirkungen, welche die Inanspruchnahme ärztlicher Hilfe nötig machten, traten im Verlauf der Studie bei keinem der eingeschlossenen Patienten auf.

Pat. Nr.	Alter	Geschlecht	Jahre seit Diagnosestellung	Allergien	PC ₂₀	PEF	FEV ₁	arg16gly	gln27glu
1	20	m	13	P, S, T	4	71,7	91,9	Gly/Gly	Gln/Gln
2	19	m	5	S, T	3,8	70,8	81,8	Gly/Gly	Glu/Glu
3	20	m	8	P, S	4,5	90,5	105,7	Arg/Gly	Gln/Gln
4	18	m	5	P	0,2	58,8	84,2	Arg/Gly	Gln/Glu
5	36	w	5	P, S, T	5	95,2	103,6	Gly/Gly	Gln/Glu
6	19	w	11	P, S, T	3,3	74	102,2	Gly/Gly	Gln/Gln
7	39	w	6	P, T	4,2	64,5	86,8	Arg/Arg	Gln/Gln
8	20	w	10	P, S	3,8	97,5	109,1	Arg/Gly	Gln/Glu
9	42	w	10	P	5,5	106,8	115,3	Arg/Gly	Gln/Glu
10	44	m	8	S	0,4	81	82,5	Arg/Gly	Gln/Glu
11	18	m	3	P	2,8	112,1	95,8	Gly/Gly	Glu/Glu
12	29	m	3	P, T	5,5	57,9	88,7	Gly/Gly	Glu/Glu
13	18	m	6	S, T	0,8	63,7	89,9	Arg/Gly	Gln/Gln
14	38	m	28	P, S	0,8	62,1	92	Arg/Gly	Gln/Glu
15	26	w	10	P, S	1,5	104,7	93,2	Arg/Gly	Gln/Glu
16	19	m	10	P, S, T	1,4	68,7	97,3	Gly/Gly	Glu/Glu
17	19	w	8	P, S, T	8	57,3	87	Arg/Gly	Gln/Glu
18	20	w	15	P	2,7	110,3	106	Arg/Gly	Gln/Glu

Tabelle 3.1: Patientencharakteristika und Lungenfunktionscharakteristika vor Beginn der Salmeterol-Inhalationen: m=männlich; w=weiblich; P=Pollen; S=Hausstaubmilben; T=Tierhaare; FEV₁ in % vom Soll; PEF=Peak Flow in % vom Soll; PC₂₀ in mg/ml; Arg=Arginin; Gly=Glycin; Glu=Glutaminsäure; Gln=Glutamin

3.2 Lungenfunktion und Atemwegshyperreagibilität

Wie in Grafik 3.1 dargestellt, veränderten sich die FEV₁ (in % vom Soll) sowie der Peak Flow (PEF in % vom Soll) im Zuge der 14-tägigen Salmeterol-Monotherapie nicht signifikant. Die Kombinationstherapie mit Salmeterol und Fluticason führte zu einem Anstieg der FEV₁- und PEF-Median-Werte im Vergleich zur Baseline sowie zur Lungenfunktion nach Monotherapie mit Salmeterol. Statistisch signifikant waren die Abweichungen jedoch nicht (Grafik 3.1). Nach 14-tägiger Salmeterol-Monotherapie kam es zu keiner signifikanten Änderung der PC₂₀ (Grafik 3.2). Es war jedoch bei 12 von 18 Patienten ein Abfall der PC₂₀ unter Salmeterol-Monotherapie zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu waren die PC₂₀-Werte im Anschluss an die Kombinationstherapie im Vergleich zur Baseline bei 15 Patienten und im Vergleich zur Messung nach Monotherapie bei 16 Patienten erhöht. Daraus ergibt sich für die Atemwegshyperreagibilität insgesamt eine statistisch signifikante Verbesserung

durch den Zusatz von Fluticason zur Salmeteroltherapie (Grafik 3.2).

3.3 BDNF-Konzentrationen in Serum, Thrombozyten und Plasma

Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich der BDNF-Konzentrationen im Plasma zum Studienbeginn (Median 0,09 ng/ml), nach der Salmeterol-Monotherapie (Median 0,08 ng/ml) und nach der Kombinationstherapie (Median 0,08 ng/ml). Im Gegensatz dazu ergaben sich statistisch signifikante Veränderungen der BDNF-Konzentrationen im Serum sowie in den Thrombozyten: Verglichen mit der Baseline stiegen die Werte nach 14-tägiger Salmeterol-Monotherapie signifikant an und sanken nach anschließender Kombinationstherapie wieder signifikant ab (Abbildung 3.3). Eine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenanzahl wurde nicht festgestellt, Median vor Therapie: $247 \times 10^6/\text{ml}$, Median nach Monotherapie: $247 \times 10^6/\text{ml}$, Median nach Kombinationstherapie: $255 \times 10^6/\text{ml}$.

3.4 Zusammenhang zwischen den Veränderungen der BDNF-Konzentrationen und der PC_{20}

Grafik 3.4 zeigt, dass die Veränderungen der PC_{20} -Werte mit den Veränderungen der BDNF-Konzentrationen in Serum und Thrombozyten nach Ende der Salmeterol-Monotherapie korrelieren. Diese Korrelation ergab sich nach Kombinationstherapie mit Salmeterol und Fluticason nicht, obwohl zu diesem Zeitpunkt die BDNF-Konzentrationen signifikant gesunken und die PC_{20} -Werte signifikant gestiegen waren (Daten nicht gezeigt).

3.5 Bedeutung des Beta2-Rezeptor-Polymorphismus

In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der Analyse der Beta2-Rezeptor-Polymorphismen arg16gly und gln27gly aufgezeigt. Hiermit sollte geprüft werden, ob der Effekt von

Salmeterol auf die Atemwegshyperreagibilität möglicherweise mit dem Beta2-Polymorphismus zusammenhängt. Bezüglich des arg16gly-Polymorphismus waren 7 Patienten homozygot für Glycin, 1 Patient homozygot für Arginin und 10 Patienten heterozygot. Bezüglich des gln27glu-Polymorphismus waren 4 Patienten homozygot für Glutaminsäure, 5 Patienten homozygot für Glutamin und 9 Patienten heterozygot. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zu den Veränderungen der PC₂₀-Werte nach Salmeterol-Therapie ergab sich weder für den arg16gly-Polymorphismus ($r=0,11$, $p=0,65$) noch für den gln27glu-Polymorphismus ($r=0,34$, $p=0,17$) (siehe Grafik 3.5).

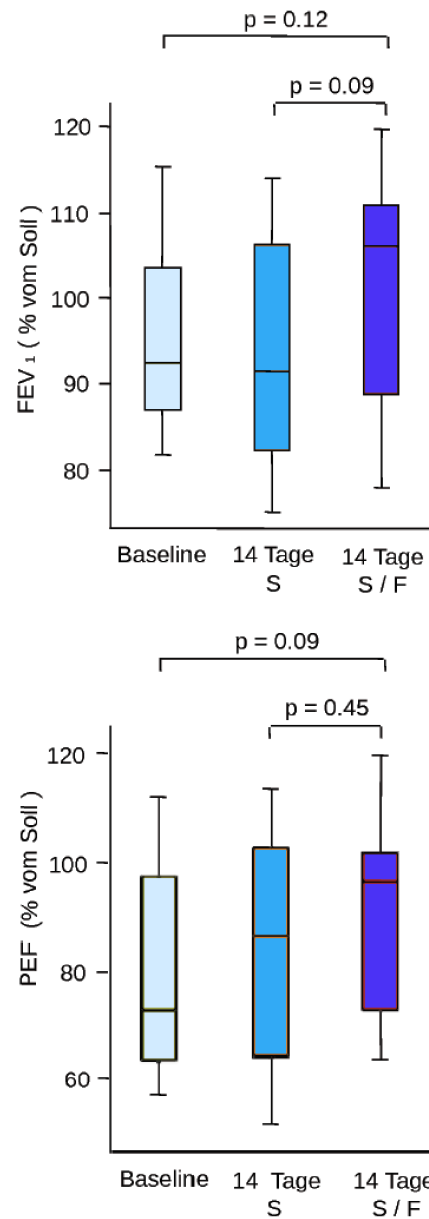


Abbildung 3.1: Lungenfunktion: Gezeigt werden in der oberen Grafik die FEV₁ in % vom Soll sowie in der unteren Grafik der Peak Flow (PEF) in % vom Soll der 18 Studienpatienten zu Studienbeginn (hellblau), nach 14 Tagen Monotherapie mit Salmeterol (mittelblau) sowie nach 14 Tagen Kombinationstherapie mit Salmeterol/Fluticason (dunkelblau). Die Ergebnisse sind als Boxplot mit dem Median (Linie in der Box), dem Interquartilenabstand (Abstand zwischen oberer und unterer Boxkante) und dem Bereich der Werte, die weniger als 1,5 Interquartilenabstände vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind (vertikale Linie), dargestellt. Extremwerte und Ausreißer (>1,5 Interquartilenabstände von der oberen oder unteren Boxkante) wurden nicht dargestellt.

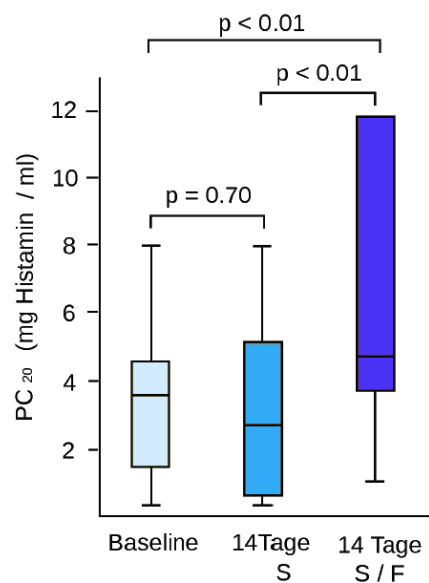


Abbildung 3.2: Bronchiale Hyperreagibilität: Gezeigt wird die PC_{20} der 18 Studienpatienten zu Studienbeginn (hellblau), nach 14 Tagen Monotherapie mit Salmeterol (mittelblau) sowie nach 14 Tagen Kombinationstherapie mit Salmeterol / Fluticason (dunkelblau). Die Ergebnisse sind als Boxplot mit dem Median (Linie in der Box), dem Interquartilenabstand (Abstand zwischen oberer und unterer Boxkante) und dem Bereich der Werte, die weniger als 1,5 Interquartilenabstände vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind (vertikale Linie), dargestellt. Extremwerte und Ausreißer ($>1,5$ Interquartilenabstände von der oberen oder unteren Boxkante) wurden nicht dargestellt.

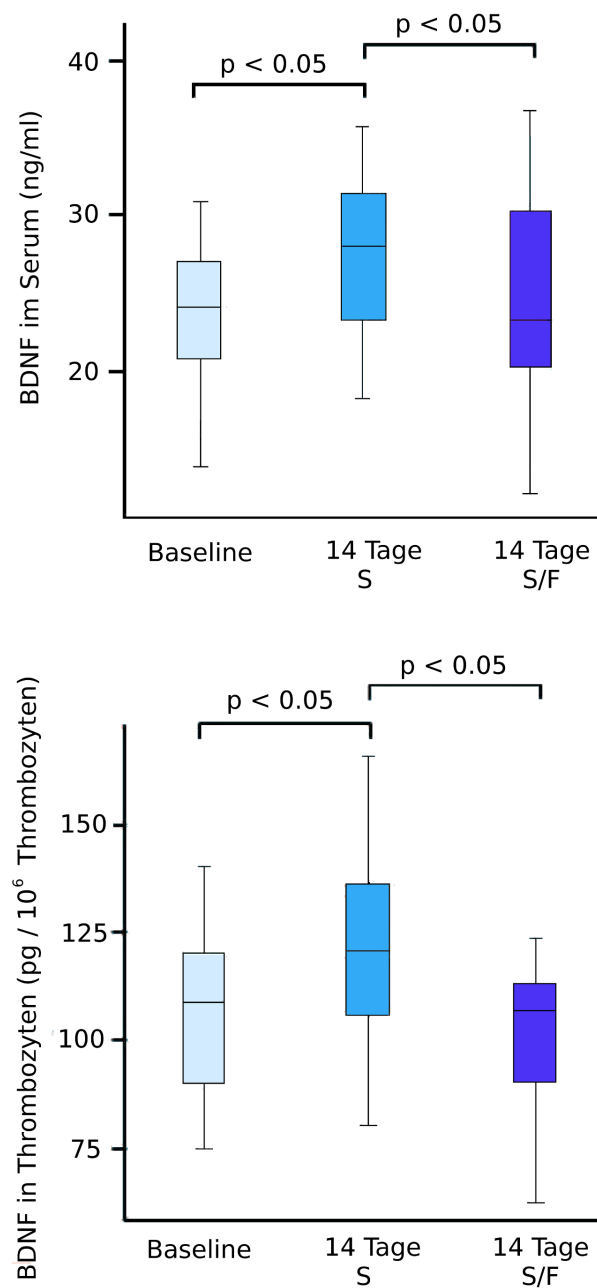


Abbildung 3.3: Veränderungen von BDNF in Serum und Thrombozyten: Gezeigt werden die BDNF-Konzentrationen im Serum (in ng/ml Serum, obere Grafik) sowie in den Thrombozyten (in pg/10⁶ Thrombozyten, untere Grafik) der 18 Studienpatienten jeweils zu Studienbeginn (hellblau), nach 14 Tagen Monotherapie mit Salmeterol (mittelblau) sowie nach 14 Tagen Kombinationstherapie mit Salmeterol / Fluticason (dunkelblau). Die Ergebnisse sind als Boxplot mit dem Median (Linie in der Box), dem Interquartilenabstand (Abstand zwischen oberer und unterer Boxkante) und dem Bereich der Werte, die weniger als 1,5 Interquartilenabstände vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind (vertikale Linie), dargestellt. Extremwerte und Ausreißer (>1,5 Interquartilenabstände von der oberen oder unteren Boxkante) wurden nicht dargestellt.

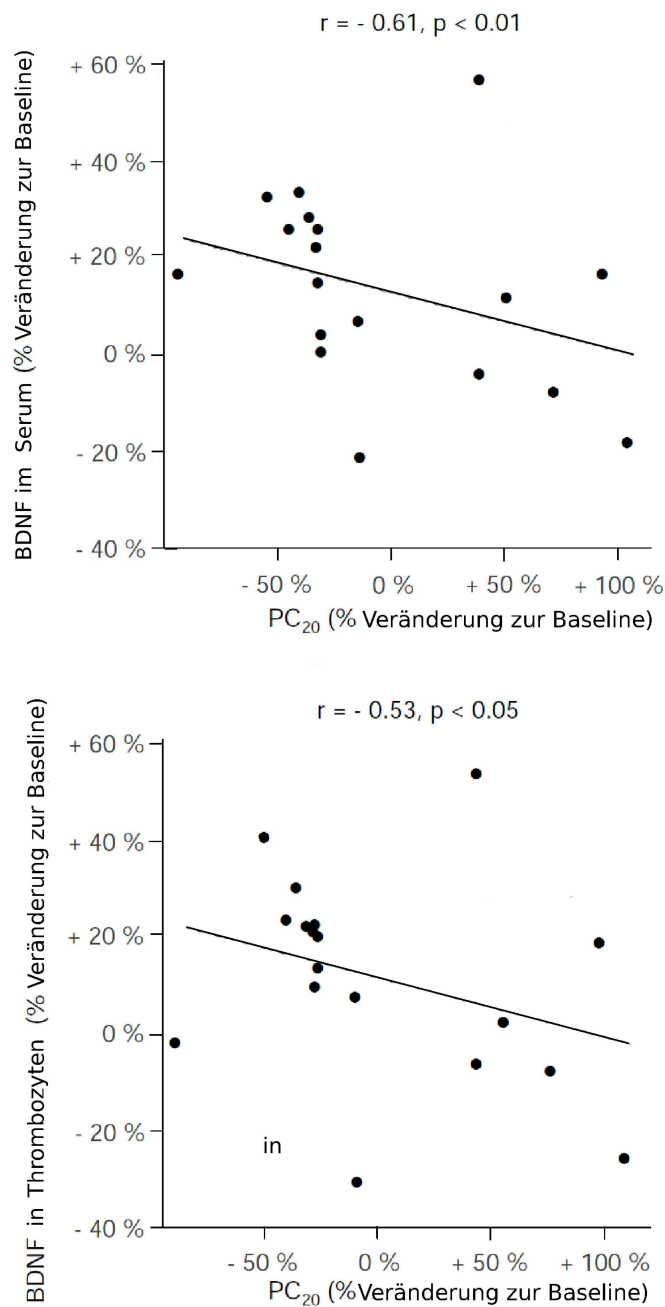


Abbildung 3.4: Zusammenhang zwischen BDNF und PC₂₀: Gezeigt werden die Korrelationen der BDNF-Veränderungen im Serum (obere Grafik) sowie in den Thrombozyten (untere Grafik) mit der Veränderung der PC₂₀-Werte der 18 Studienpatienten nach 14 Tagen Salmeterol-Monotherapie. Jeder Punkt repräsentiert einen Patienten. Die Linie stellt die Regressionslinie berechnet mittels SPSS dar. Der Spearman-Korrelations-Koeffizient (r) sowie die Signifikanz (p) sind jeweils oberhalb der Grafik angegeben.

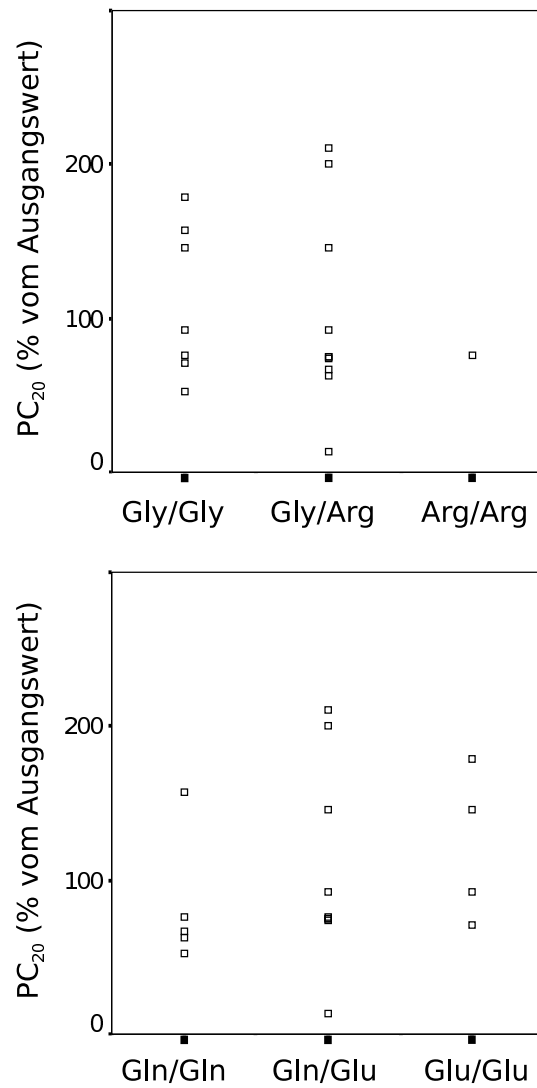


Abbildung 3.5: Zusammenhang zwischen der Änderung der bronchialer Hyperreagibilität und zwei Beta-Rezeptor-Polymorphismen. Gezeigt werden die Veränderungen der PC₂₀-Werte nach der Salmeterol-Monotherapie in % vom Ausgangswert in Abhängigkeit von der Glycin/Arginin-Mutation (oben) beziehungsweise der Glutamin/Glutamat-Mutation (unten) des Beta-Rezeptors.

Kapitel 4

Diskussion

Inhalative Beta2-Mimetika werden aus zwei Gründen in der Therapie des Asthma bronchiale eingesetzt. In der Akuttherapie bewirken sie als Bedarfsmedikation eine rasche Bronchodilatation. In der Dauertherapie können sie die Asthmakontrolle verbessern, wenn sie in Kombination mit einem inhalativen Glucocorticoid eingesetzt werden [80, 81]. Bezüglich der Monotherapie mit Beta-Mimetika zeigen zahlreiche Studien jedoch einen paradoxen Verlust der Asthmakontrolle und einen konsekutiven Anstieg der Mortalität [82, 74, 75]. Daher sind Betamimetika als Dauertherapie des Asthma bronchiale kontraindiziert. Die Gründe für den Verlust an Asthmakontrolle unter Betamimetika-Monotherapie sind bislang unklar. Erklärungsansätze bieten Studien, in denen ein Anstieg der bronchialen Hyperreagibilität mit einer regelmäßigen Beta-Mimetika-Monotherapie in Zusammenhang gebracht wird [83, 84, 85]. Dies kann zumindest teilweise mit einer veränderten Aktivität bronchialer Neuronen durch Beta-Mimetika erklärt werden [86]. Ein mechanistisches Bindeglied zwischen Betamimetika-Therapie und veränderter neuronaler Aktivität war bislang jedoch nicht bekannt.

Ein potentieller Mediator für die Veränderung der neuronalen Aktivität in den Atemwegen ist das Neurotrophin BDNF [87, 88]. Eine verstärkte Sekretion von BDNF durch Leukozyten und Epithelien in allergisch-entzündlich veränderten Atemwegen konnte in Tiermodellen nachgewiesen werden [65, 89]. Hier konnte einerseits bei Allergen-sensibilisierten Mäusen eine Reduktion der Atemwegshyperreagibilität durch Inhibition von BDNF in den Atemwegen erreicht werden und andererseits bei gesunden Mäusen eine Atemwegshyperreagibilität durch Verabre-

ichung von BDNF provoziert werden. Die gleiche Studie belegt den Zusammenhang zwischen diesen Effekten und den Veränderungen neuronaler Aktivität in den Atemwegen [64]. Eine weitere Studie mit Meerschweinchen konnte diese Ergebnisse bestätigen [90]. Folglich konnte anhand von Tiermodellen nachgewiesen werden, dass BDNF die neuronale Aktivität in den Atemwegen steigert und damit zu neuronaler Dysfunktion und bronchialer Hypereagibilität in allergisch-entzündlich veränderten Atemwegen beiträgt [91].

4.1 Wirkungen von Salmeterol

Bei Patienten mit Asthma könnte die gesteigerte Konzentration von BDNF in den Thrombozyten Ausdruck der gesteigerten BDNF-Produktion in den Lungen sein [16]. Es ist jedoch auch denkbar, dass bei Patienten mit Asthma eine genuine Erhöhung der BDNF-Thrombozytenkonzentration beziehungsweise der BDNF-Freisetzung aus Thrombozyten vorliegt. BDNF wird nicht von den Thrombozyten oder deren Vorstufen produziert, sondern vielmehr aktiv von ihnen aufgenommen [56]. Die BDNF-Konzentration kann somit als Maß für die BDNF-Sekretion der Organe des menschlichen Körpers für einen Zeitraum von einigen Tagen gelten [59]. Der Zusammenhang zwischen Thrombozyten-BDNF und dem Schweregrad der Atemwegshyperreagibilität bei Patienten mit Asthma könnte verschiedene Ursachen haben. Einerseits könnte eine gesteigerte BDNF-Konzentration in den Atemwegen sowohl zu einer Verstärkung der bronchialen Hyperreagibilität als auch zu einer vermehrten Aufnahme von BDNF in Thrombozyten führen. Andererseits ist es vorstellbar, dass Thrombozyten-BDNF eine kausale Rolle beim Asthma spielt, denn es wurde gezeigt, dass Thrombozyten aktiv in die Lunge wandern und an funktionellen Veränderungen im allergisch entzündlichen Gewebe beteiligt sind [92, 93]. Es kann folglich spekuliert werden, dass nicht nur die pathologisch gesteigerte Produktion von BDNF durch Leukozyten und Epithelien in den Atemwegen, sondern auch die Freisetzung von BDNF aus Thrombozyten (und möglicherweise eine genuine BDNF-Überladung der Thrombozyten von Patienten mit Asthma) eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität beim Asthma spielt.

In der vorliegenden Studie führte die 14-tägige Salmeteroltherapie bei Patienten

mit allergischem Asthma zu einem signifikanten Anstieg der Thrombozyten-BDNF-Konzentrationen in vivo. Diese in vivo Beobachtung stimmt mit publizierten in vitro Daten überein. Der Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Atemwegshyperreagibilität und den Veränderungen der BDNF-Konzentrationen lässt vermuten, dass BDNF tatsächlich zur Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität beim Asthma und zu den bekannten vegetativen Effekten der Salmeterol-Monotherapie beiträgt. Der zugrunde liegende Mechanismus der BDNF-Steigerung durch Salmeterol bleibt bislang ungeklärt. Es wurde jedoch postuliert, dass Salmeterol die Transkription von Genen mit sogenannten “cAMP response elementen“ im Bereich ihres Promotors steigert [94]. Da BDNF über diese “cAMP response elemente“ verfügt [95], könnte vermutet werden, dass Salmeterol über diesen Weg die Produktion von BDNF fördert. Dies wurde jedoch bei Patienten mit Asthma oder im Tiermodell des Asthma noch nicht explizit gezeigt.

4.2 Wirkungen von Fluticason

Die Begleittherapie mit Fluticason führte zu einem signifikanten Abfall der Thrombozyten-BDNF-Konzentration. Es wurde schon gezeigt, dass inhalative Corticosteroide wie beispielsweise Fluticason die Sekretion von BDNF durch Leukozyten [67] und auch die BDNF-Spiegel im Serum von Patienten mit allergischem Asthma senken [68]. Inhalative Corticosteroide können die Atemwegshyperreagibilität bei Patienten senken. Folglich könnte die Senkung der BDNF-Spiegel durch inhalative Corticosteroide, welche in dieser und in vorangegangenen Studien beobachtet wurde [96, 67], ein weiterer Hinweis auf eine Rolle von BDNF in der Pathogenese der bronchialen Hyperreagibilität bei Asthma bronchiale sein. Der Benefit für die Asthmatherapie, der sich aus der Kombination eines lang wirksamen Betamimetikums (LABA) mit einem inhalativen Corticosteroid ergibt, könnte demzufolge mit einer Suppression der LABA-induzierten Überexpression von BDNF zusammenhängen. Interessanterweise korrelierte der Abfall der BDNF-Spiegel nach Kombinationstherapie in unserer Studie nicht mit dem Abfall der PC₂₀-Werte. Dies liegt möglicherweise an den vielfältigen Effekten von Fluticason auf andere Zelltypen in den Atemwegen, die ebenfalls einen Einfluss auf die Atemwegsreagibilität haben.

4.3 Einfluss von Beta-Rezeptor-Polymorphismen

In der vorliegenden Studie wurde bei der Mehrheit der Patienten eine Verschlechterung der Atemwegshyperreagibilität infolge der Salmeterol-Monotherapie beobachtet. Diese Daten werden durch viele andere Studien unterstützt, die nachteilige Effekte lang-wirksamer [97, 98] und kurz-wirksamer [83, 84, 85] Beta2-Mimetika auf die Atemwegsreagibilität beim Asthma bronchiale belegen. Es fand sich jedoch kein Zusammenhang zwischen Beta-Rezeptor-Polymorphismen und den Veränderungen der PC_{20} -Werte nach der Salmeterol-Monotherapie (Abbildung 3.5). Diese Beobachtung wird durch jüngere Analysen gestützt, welche zeigen, dass diese Polymorphismen das therapeutische Ansprechen von Patienten mit allergischem Asthma auf LABA nicht beeinflussen [99]. Somit vermuten wir, dass auch die Effekte der LABA auf die Atemwegshyperreagibilität von Patienten mit Asthma nicht durch Beta-Rezeptor-Polymorphismen erklärt werden können.

4.4 Andere mögliche Wirkungen einer Salmeterol-induzierten BDNF-Steigerung

In der vorliegenden Arbeit wird vor allem der mögliche negative Effekt einer BDNF-Steigerung auf die bronchiale Hyperreagibilität und das Asthma diskutiert. Es muss jedoch erwähnt werden, dass bei einer Reihe von neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen positive Effekte einer BDNF-Steigerung beschrieben werden. Es sollen hier exemplarisch einige dieser Erkrankungen diskutiert werden.

Morbus Alzheimer

Der fortschreitende Verlust von Neuronen im Hippocampus und dem entorhinalen Cortex ist der Grund für den Funktionsverlust des Kurzzeitgedächtnisses [100, 101, 102], das Leitsymptom des Morbus Alzheimer. In Tiermodellen zum Morbus Alzheimer mit Mäusen, Ratten und Affen hat die Applikation von BDNF in den entorhinalen Cortex zu einer Verbesserung der Gedächtnisleistung der Tiere geführt [103]. Beispielsweise zeigte sich nach Infusion von BDNF in den entorhinalen Cortex von Ratten ein Rückgang altersbedingter Veränderungen der Genexpression im entorhinalen Cortex und Hippocampus mit konsekutiver Verbesserung von Lernen und Gedächtnis [103], und bei Primaten eine Milderung

des neuronalen Zelltodes nach Läsionen im entorhinal-hippocampalen System [103]. Diese Ergebnisse weisen auf einen möglichen therapeutischen Nutzen von BDNF beim Morbus Alzheimer hin. Klinische Studien stehen derzeit allerdings noch aus.

Morbus Parkinson

Die neurodegenerative Erkrankung Morbus Parkinson ist vor allem durch die Symptomtrias Rigor, Tremor und Akinesie als Ausdruck der Degeneration dopaminerger Neuronen der Substantia nigra gekennzeichnet [104]. Eine reduzierte Expression von BDNF in diesem Gebiet bei Patienten mit Morbus Parkinson konnte schon nachgewiesen werden [105, 106]. In Tiermodellen mit Ratten [107, 108] als auch Primaten [109] ist eine unterstützende Wirkung von BDNF auf das Überleben dopaminerger Neuronen und die Verminderung des Zelltodes nachgewiesen worden. Auch beim Morbus Parkinson gibt es dazu derzeit noch keine klinischen Studien am Menschen.

Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose ist durch eine schnell fortschreitende Atrophie der Motoneuronen gekennzeichnet, die innerhalb von zwei Jahren zu einer generalisierten Muskelschwäche und schließlich zum Atemstillstand führt. Eine Prävention der Degeneration von spinalen und corticospinalen Motoneuronen durch BDNF ist in Tiermodellen bereits nachgewiesen worden [110, 111, 112]. Mehrere klinische Studien mit BDNF konnten bislang jedoch keinen Benefit für das Überleben der ALS-Patienten zeigen [113, 114, 115]. Die Daten belegen, dass BDNF weder systemisch noch in den Liquor infundiert die degenerierten Motoneuronen adäquat erreicht [116, 117].

Depression

Auch bipolare Störungen und Depressionen scheinen eine Verbindung zum Nervenwachstumsfaktor BDNF aufzuweisen. BDNF wird in der aktuellen Literatur eine besondere Bedeutung in der Pathogenese der Depression zugeschrieben [118]. Bei betroffenen Patienten ist eine spezifische Reduktion des hippocampalen Hirnvolumens [119] und ebenso der hippocampalen BDNF-Spiegel [120] und Serum-BDNF-Spiegel [121] gezeigt worden. Bei Mäusen konnte depressives Verhalten durch einen isolierten BDNF-Abfall im Hippocampus induziert werden [122].

Antidepressive Pharmaka normalisieren sowohl die Hirnvolumenminderung [123] als auch die BDNF-Spiegel in Serum [124, 125] und Hippocampus [126]. Allerdings sprechen depressive Patienten über die ersten Wochen der Anwendung verzögert auf die Medikation an. In dieser Zeit kommt es zum Wachstum neuer neuronaler Verbindungen und zu einer Reorganisation im Gehirn [127]. BDNF wird eine regulierende Rolle bei dieser “neuronalen Plastizität” zugeschrieben [128]. Jedoch hat ein Anstieg der BDNF-Spiegel wohl keine direkte stimmungsaufhellende Wirkung, sondern stößt innerhalb stimmungsregulierender Netzwerke eine Signalkaskade mit antidepressiver Wirkung an [127, 129].

Die Forschungen bezüglich des therapeutischen Einsatzes von BDNF bei den genannten Krankheitsbildern stoßen an eine gemeinsame Grenze: eine effektive und sichere Methode, BDNF an seinen Wirkort (die Neuronen im Zentralnervensystem) zu bringen, ist bislang nicht gefunden worden [130]. Wird BDNF systemisch appliziert, passiert nur eine minimale Menge des Nervenwachstumsfaktors die Blut-Hirnschranke [130]. Bei der intrathekalen oder intraventrikulären Infusion von BDNF werden die oberflächlichen Hirnschichten nicht in dem Maße penetriert, dass eine ausreichende Dosierung im tieferen Parenchym erreicht wird [131]. Eine Dosissteigerung birgt jedoch die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen wie beispielsweise Gewichtsverlust, Diarrhoe oder Dysästhesien [113, 132, 133, 134]. Für dieses Problem gibt es aktuell drei verschiedene Lösungsansätze. Zum einen könnten in das Zielgebiet implantierte Pumpen eine direkte, kontinuierliche und steuerbare Infusion des Nervenwachstumsfaktors gewährleisten [130]. Bei dieser Applikationsform treten bislang jedoch Probleme wie Reflux des Pharmakons entlang der Infusionsnadel mit Streuung in den Liquor [135] und direkte Gewebsschädigung durch hohe Flussraten auf, während geringere Flussraten zu keiner effizienten Dosierung in der Zielregion führen [136]. Zum anderen gibt es die Möglichkeit des Gentransfers mit viralen Vektoren, wodurch beispielsweise gezielt Zellen des angestrebten Hirngebietes zur Produktion des Nervenwachstumsfaktors angeregt und andere Gebiete weitestgehend unbeeinflusst belassen werden könnten [130]. Klinische Studien mit Parkinson-Patienten haben bislang keine nachteiligen Effekte gezeigt [137, 138, 139], jedoch ist auch die therapeutische Effizienz bislang nicht belegt worden [130]. Ergebnisse einer klinischen Studie zur Gentransfer-vermittelten Überexpression von NGF im Nucleus basalis beim Morbus Alzheimer werden 2012

erwartet [130]. Der dritte Ansatz besteht darin, dass man durch verschiedene Pharmaka, wie zum Beispiel Antidepressiva [124, 125, 126], die BDNF-Produktion im Zentralnervensystem indirekt steigert. Der in unserer Studie gezeigte Anstieg der systemischen BDNF-Spiegel unter Salmeterol-Therapie könnte daher in diesem Zusammenhang einen neuen therapeutischen Ansatz zur Steigerung von BDNF-Konzentrationen im Körper bei neurodegenerativen oder psychiatrischen Erkrankungen aufzeigen. Es bleibt jedoch noch ungeklärt, inwieweit inhalierte oder systemisch applizierte Betamimetika zu einer ausreichenden Steigerung der BDNF-Spiegel im Zentralnervensystem führen können.

4.5 Methodenkritik

Aus wissenschaftlicher Sicht wäre ein Crossover-Studiendesign sinnvoll gewesen, um einen Einfluss der Abfolge der Therapie auszuschliessen. Dies wurde aufgrund von ethischen und Sicherheitsaspekten unterlassen. Ein Studienarm, aus dem die Patienten nach ausschließlicher Monotherapie mit dem Beta2-Mimetikum (mit den möglichen nachteiligen Effekten auf Asthmakontrolle und Mortalität) entlassen worden wären, hätte den internationalen Richtlinien widersprochen, welche besagen, dass LABAs nicht zur Monotherapie des Asthma eingesetzt werden dürfen. Aus diesem Grunde wurde, auch wenn dies bei Patienten mit leichtgradigem Asthma übervorsichtig erscheinen mag, eine Crossover-Studie nicht durchgeführt. Diese Entscheidung wird durch die Resultate der Studie bekräftigt, welche eine Verschlechterung der Atemwegshyperreagibilität bei einem beträchtlichen Teil der Teilnehmer nach Salmeteroltherapie zeigen. Ein weiterer potentieller Kritikpunkt ist das Fehlen eines Placeboarmes. Dieser Placeboarm hätte mögliche Einflüsse des Wissens auf die aktuelle Mediaktion auf die erhobenen Ergebnisse ausgeschlossen. Allerdings bleibt zu bemerken, dass ein direkter Einfluss des Wissens um die Medikation auf den BDNF-Spiegel im Blut sehr unwahrscheinlich erscheint. Desweiteren decken sich die erhobenen in vivo Daten sehr gut mit den publizierten in vitro Daten zum Einfluss von Salmeterol/Fluticason auf BDNF. Somit sehen wir einen möglichen Placebo-Effekt in dieser Studie als marginal an.

4.6 Hypothese

Die vorliegenden Studienergebnisse zeigen, dass eine Monotherapie mit Salmeterol bei Patienten mit leichtgradigem Asthma eine Steigerung der BDNF-Thrombozytenkonzentration zufolge hat und eine Veränderung der Atemwegshyperreagibilität mit diesem Effekt assoziiert ist. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass inhalative Beta2-Mimetika über eine Steigerung der BDNF-Thrombozytenbeladung beziehungsweise direkt über eine lokale Steigerung der BDNF-Produktion und die nachfolgende Steigerung der neuronalen Aktivität in den Atemwegen negative Effekte auf die Asthmakontrolle haben. Mit einer begleitenden inhalativen Corticosteroid-Medikation können diese Effekte aufgehoben werden.

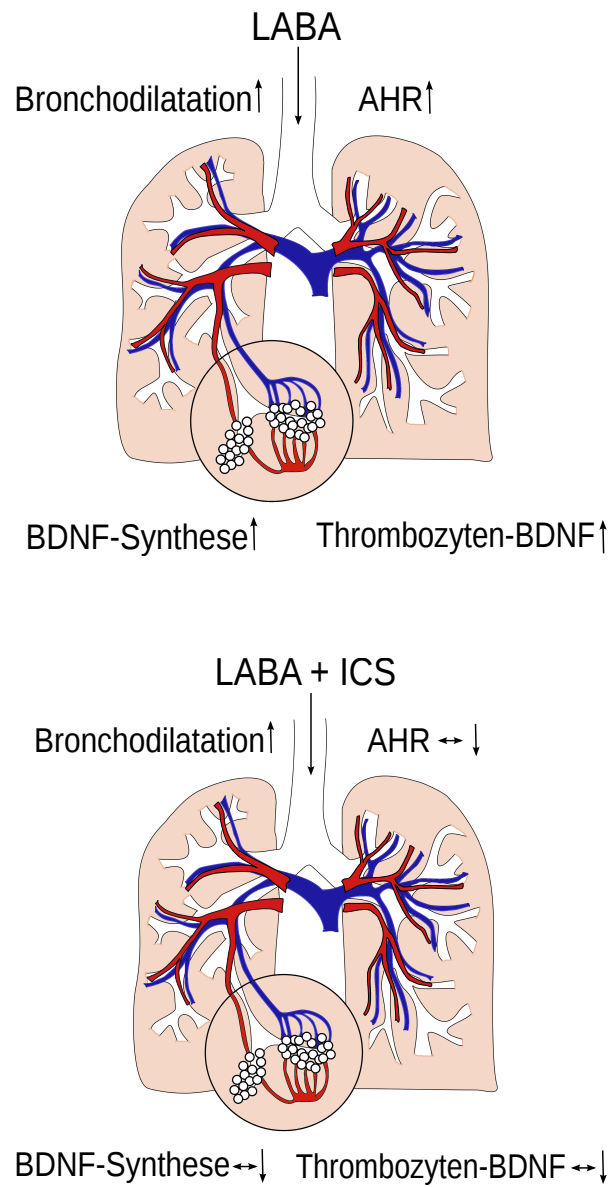


Abbildung 4.1: Hypothese: Inhalative Beta2-Mimetika steigern die BDNF-Synthese und die BDNF-Thrombozytenbeladung und somit die Atemwegshyperreagibilität (oben). Die Kombination mit einem inhalativen Corticosteroid hebt diese Effekte auf (unten).

Kapitel 5

Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine Volkskrankheit, die durch rezidivierende Atemwegsobstruktionen charakterisiert ist und die pathophysiologisch auf einer bronchialen Hyperreagibilität beruht. Inhalative Beta2-Mimetika, die eine potente antiobstruktive Wirkung bei Asthma haben, sind als Monotherapie des Asthma kontraindiziert, da sie paradoxerweise zu einem Verlust an Asthmakontrolle und zu einer Mortalitätssteigerung führen. Es wurde postuliert, dass die Ursache dieses Phänomens in einer Steigerung der bronchialen Hyperreagibilität durch inhalative Beta2-Mimetika begründet liegt, der zugrunde liegende Mechanismus war bislang jedoch unklar. Der Nervenwachstumsfaktor Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) wurde vor kurzem als Mediator der bronchialen Hyperreagibilität beim allergischen Asthma identifiziert, der Einfluss inhalativer Beta2-Mimetika auf die BDNF-Spiegel von Patienten mit allergischem Asthma war jedoch bislang unbekannt. In der vorliegenden klinischen Studie wurden Patienten mit allergischem Asthma über 2 Wochen lang mit dem langwirksamen inhalativen Beta2-Mimetikum Salmeterol und danach 2 Wochen lang mit Salmeterol und dem inhalativen Corticosteroid Fluticason (als Kombinationstherapie) behandelt. Die BDNF-Spiegel im Serum stiegen unter der Salmeterol-Monotherapie signifikant an, und sanken unter der Kombinationstherapie Salmeterol/Fluticason wieder auf das Ausgangsniveau ab. Die Verschlechterung der bronchialen Hyperreagibilität nach Salmeterol-Monotherapie korrelierte mit dem Anstieg der BDNF-Konzentrationen, nicht jedoch mit Beta2-Rezeptor-Polymorphismen, die in der Vergangenheit als mögliche Ursachen einer paradoxen Beta2-Mimetika-Wirkung bei Asthma bronchiale postuliert wurden.

Die vorliegenden Studienergebnisse zeigen, dass eine Monotherapie mit Salmeterol bei Patienten mit leichtgradigem Asthma eine Steigerung der BDNF-Thrombozytenkonzentration zufolge hat und eine Veränderung der Atemwegshyperreagibilität mit diesem Effekt assoziiert ist. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass inhalative Beta2-Mimetika über eine Steigerung der BDNF-Thrombozytenbeladung beziehungsweise direkt über eine lokale Steigerung der BDNF-Produktion und die nachfolgende Steigerung der neuronalen Aktivität in den Atemwegen negative Effekte auf die Asthmakontrolle haben. Mit einer begleitenden inhalativen Corticosteroid-Medikation können diese Effekte aufgehoben werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Global Initiative for Asthma GINA. International consensus report: Global strategy for asthma management and prevention. *National Institutes of Health NIH*, 2002.
- [2] Bachert C, Lange B, and Virchow JC. *Asthma und allergische Rhinitis - eine Erkrankung mit zwei Gesichtern*. 2005.
- [3] van Schayck CP and Smit HA. The prevalence of asthma in children: a reversing trend. *Eur Respir J*, 26:647–50, 2005.
- [4] Busse WW and Jr. Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med*, 344:350–62, 2001.
- [5] Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, and Walls CM. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, 356:2144–8, 2000.
- [6] Djukanovic R, Wilson SJ, Kraft M, Jarjour NN, Steel M, Chung KF, and et al. Effects of treatment with anti-immunoglobulin e antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 170:583–93, 2004.
- [7] Nair P, Pizzichini MMM, and Kjarsgaard M et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med*, 360:985–993, 2009.
- [8] Hargreave FE, Sterk P, Adelroth EC, Ramsdale EH, and O'Byrne PM. Airway responsiveness to histamine or methacholine: advances in measurement and interpretation. *Respiration*, 50:72–6, 1986.

- [9] Wahn U, Asher I, Boner A, Chuchalin A, Custovic A, Dagli E, and et al. Prevention of allergy and asthma: interim report. *Allergy*, 55:1069–73, 2000.
- [10] Lambrecht BN. The dendritic cell in allergic airway diseases: a new player to the game. *Clin Exp Allergy*, 31:206–18, 2001.
- [11] Virchow JC. Bronchial asthma: extrinsic, intrinsic or mixed? *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 146:415–8, 1996.
- [12] Lommatzsch M and Virchow JC. The neural underpinnings of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 119:254–255, 2007.
- [13] Barnes PJ, Chung KF, and Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev*, 50:515–96, 1998.
- [14] Foster PS. Allergic networks regulating eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21:451–4, 1999.
- [15] Williams TJ. The eosinophil enigma. *J Clin Invest*, 113:507–9, 2004.
- [16] Virchow JC, Julius P, Lommatzsch M, Luttmann W, Renz H, and Braun A. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Respir Crit Care Med*, 158:2002–5, 1998.
- [17] John M et al. Inhaled corticosteroids increase il-10 but reduce mip-1-alpha, gm-csf and ifn-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:256–262, 1998.
- [18] Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, and Holgate ST. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol*, 111:215–25, 2003.
- [19] Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nature*, 3:831–844, 2004.
- [20] Barnes PJ. Neural control of human airways in health and disease. *Am Rev Respir Dis*, 134:1289–314, 1986.
- [21] Verleden GM. Neural mechanisms and axon reflexes in asthma. where are we? *Biochem Pharmacol*, 51:1247–57, 1996.

- [22] Richardson JB. Nerve supply to the lungs. *Am Rev Respir Dis*, 119:785–802, 1979.
- [23] Zaagsma J, van der Heijden PJ, and Bank CM van der Schaar MW. Comparison of functional beta-adrenoceptor heterogeneity in central and peripheral airway smooth muscle of guinea pig and man. *J Recept Res*, 3:89–106, 1983.
- [24] J. C. Virchow and M. Lommatzsch. *Anti-cholinergic agents in asthma. Therapeutic strategies in Asthma: Current treatments*. 2007.
- [25] Ward JK, Belvisi MG, Fox AJ, Miura M, Tadjkarimi S, Yacoub MH, and et al. Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. *J Clin Invest*, 92:736–42, 1993.
- [26] Fischer A, Mundel P, Mayer B, Preissler U, Philippin B, and Kummer W. Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosci Lett*, 149:157–60, 1993.
- [27] Mitchell RW, Antonissen LA, Kepron W, Kroeger EA, and Stephens NL. Effect of atropine on the hyperresponsiveness of ragweed-sensitized canine tracheal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 236:803–9, 1986.
- [28] Mitchell RW, Kroeger EA, Kepron W, and Stephens NL. Local parasympathetic mechanisms for ragweed-sensitized canine trachealis hyperresponsiveness. *J Pharmacol Exp Ther*, 243:907–14, 1987.
- [29] Barnes PJ. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev*, 72:699–729, 1992.
- [30] Undem BJ, Kajekar R, Hunter DD, and Myers AC. Neural integration and allergic disease. *Allergy Clin Immunol*, 106:S213–20, 2000.
- [31] Minette PA, Lammers JW, Dixon CM, McCusker MT, and Barnes PJ. A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J Appl Physiol*, 67:2461–5, 1989.
- [32] Jacoby DB and Fryer AD. Interaction of viral infections with muscarinic receptors. *Clin Exp Allergy*, 29 Suppl 2:59–64, 1999.

- [33] Fryer AD and Jacoby DB. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med*, 158:154–60, 1998.
- [34] Peters. Tiotropium bromide step-up therapy for adults with uncontrolled asthma. *The New England Journal of Medicine*, 363:1715–1726, 2010.
- [35] Kostreva DR, Zuperku EJ, Hess GL, Coon RL, and Kampine JP. Pulmonary afferent activity recorded from sympathetic nerves. *J Appl Physiol*, 39:37–40, 1975.
- [36] Laitinen A. Ultrastructural organisation of intraepithelial nerves in the human airway tract. *Thorax*, 40:488–92, 1985.
- [37] Inoue H, Koto H, Takata S, Aizawa H, and Ikeda T. Excitatory role of axon reflex in bradykinininduced contraction of guinea pig tracheal smooth muscle. *Am Rev Respir Dis*, 146:1548–52, 1992.
- [38] Barnes PJ. Overview of neural mechanisms in asthma. *Pulm Pharmacol*, 8:151–9, 1995.
- [39] Nieber K, Baumgarten CR, Rathsack R, Furkert J, Oehme P, and Kunkel G. Substance p and beta-endorphin-like immunoreactivity in lavage fluids of subjects with and without allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 90:646–52, 1992.
- [40] Fischer A, McGregor GP, Saria A, Philippin B, and Kummer W. Induction of tachykinin gene and peptide expression in guinea pig nodose primary afferent neurons by allergic airway inflammation. *J Clin Invest*, 98:2284–91, 1996.
- [41] Barnes PJ. Asthma as an axon reflex. *Lancet*, 1:242–5, 1986.
- [42] Boot et al.
- [43] Bessac BF and Jordt S-E. Breathtaking trp channels: Trpa1 and trpv1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology*, 23:360–370, 2008.
- [44] Caceres AI et al. A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *PNAS*, 2009.
- [45] Lewin GR and Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 19:289–317, 1996.

- [46] Davies AM. The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiol*, 25:1334–48, 1994.
- [47] Barbacid M. The trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*, 25:1386–403, 1994.
- [48] Lu B, Pang PT, and Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*, 6:603–14, 2005.
- [49] Carter BD and Lewin GR. Neurotrophins live or let die: does p75^{ntr} decide? *Neuron*, 18:187–90, 1997.
- [50] Lommatzsch M, Quarcoo D, Schulte-Herbruggen O, Weber H, Virchow JC, and Renz H et al. Neurotrophins in murine viscera: a dynamic pattern from birth to adulthood. *Int J Dev Neurosci*, 23:495–500, 2005.
- [51] Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Martin E, Burton LE, Shih A, and et al. Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology*, 129:1289–94, 1991.
- [52] Gotz R, Raulf F, and Scharf M. Brain-derived neurotrophic factor is more highly conserved in structure and function than nerve growth factor during vertebrate evolution. *J Neurochem*, 59:432–42, 1992.
- [53] McAllister AK, Katz LC, and Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 22:295–318, 1999.
- [54] Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*, 77:627–38, 1994.
- [55] Lommatzsch M, Braun A, Mannsfeldt A, Botchkarev VA, Botchkareva NV, and Paus R et al. Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. implications for paracrine and target-derived neurotrophic functions. *Am J Pathol*, 155:1183–93, 1999.
- [56] Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, and Kambayashi J et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost*, 87:728–34, 2002.

- [57] Yamamoto H and Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, 10:3469–78, 1990.
- [58] Pliego-Rivero FB, Bayatti N, Giannakoulopoulos X, Glover V, Bradford HF, and Stern G et al. Brain-derived neurotrophic factor in human platelets. *Biochem Pharmacol*, 54:207–9, 1997.
- [59] Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, and Schuff-Werner P et al. The impact of age, weight and gender on bdnf levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging*, 26:115–23, 2005.
- [60] Nawa H, Carnahan J, and Gall C. Bdnf protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mrna levels. *Eur J Neurosci*, 7:1527–35, 1995.
- [61] Staats R, Stoll P, Zingler D, Virchow JC, and Lommatzsch M. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (bdnf) during sleep apnoea treatment. *Thorax*, 60:688–92, 2005.
- [62] Ricci A, Felici L, Mariotta S, Mannino F, Schmid G, and Terzano C et al. Decreased serum brainderived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res*, 109:143–8, 2002.
- [63] Ricci A, Felici L, Mariotta S, Mannino F, Schmid G, and Terzano C et al. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30:12–19, 2004.
- [64] Braun A, Lommatzsch M, Neuhaus-Steinmetz U, Quarcoo D, Glaab T, and McGregor GP et al. Brain-derived neurotrophic factor (bdnf) contributes to neuronal dysfunction in a model of allergic airway inflammation. *Br J Pharmacol*, 141:431–40, 2004.
- [65] Braun A, Lommatzsch M, Mannsfeldt A, Neuhaus-Steinmetz U, Fischer A, and Schnoy N et al. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21:537–46, 1999.
- [66] Schulte-Herbruggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, Quarcoo D, Renz H, and Braun A. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion

- of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol*, 160(1-2):204–9, 2005.
- [67] Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J, Schuhbaeck K, Zingler D, and Zingler C et al. Brainderived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 171:115–20, 2005.
- [68] Noga O, Hanf G, Schaper C, O’Connor A, and Kunkel G. The influence of inhalative corticosteroids on circulating nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy*, 31:1906–12, 2001.
- [69] Inman WH and Adelstein AM. Rise and fall of asthma mortality in england and wales in relation to use of pressurised aerosols. *The Lancet*, 294:279–85, 1969.
- [70] Spitzer WO et al. The use of beta-agonists and the risk of death and near death from asthma. *NEJM*, 8:501–506, 1992.
- [71] Sears et al. Regular inhaled beta-agonist treatment in bronchial asthma. *Lancet*, 336:1391–1396, 1990.
- [72] O’Connor BJ, Aikman SL, and Barnes PJ. Tolerance to the nonbronchodilator effects of inhaled beta 2-agonists in asthma. *The New England Journal of Medicine*, 17:1204–1208, 1992.
- [73] Cheung D, Timmers MC, and Zwinderman AH et al. Long-term effects of a long-acting beta 2-adrenoceptor agonist, salmeterol, on airway hyperresponsiveness in patients with mild asthma. *NEJM*, 327:1198–203., 1992.
- [74] Castle W, Fuller R, and Hall J et al. Serevent nationwide surveillance study: comparison of salmeterol with salbutamol in asthmatic patients who require regular bronchodilator treatment. *BMJ*, 306:1034–7, 1993.
- [75] Nelson HS, Weiss ST, and Bleecker ER et al. The salmeterol multicenter asthma research trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol. *Chest*, 129:15–26, 2006.

- [76] Sears MR, Ottoson A, Radner F, and Suissa S. Long-acting b-agonists: a review of formoterol safety data from asthma clinical trials. *ERJ*, 33:21–32, 2009.
- [77] Badrul A et al. The fda and safe use of long-acting beta-agonists in the treatment of asthma. *The New England Journal of Medicine*, 362:1169–1171, 2010.
- [78] Lommatzsch. Adverse effects of salmeterol in asthma: a neuronal perspective. *Thorax*, 64:763–769, 2009.
- [79] Stoll P. Zur regulation des brain-derived neurotrophic factor beim obstruktiven schlafapnoe-hypopnoe-syndrom. 2005.
- [80] Pauwels RA, Lofdahl CG, and Postma DS et al. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. formoterol and corticosteroids establishing therapy (facet) international study group. *N Engl J Med*, 337:1405–11, 1997.
- [81] Bateman ED, Boushey HA, and Bousquet J et al. Can guideline-defined asthma control be achieved? the gaining optimal asthma control study. *Am J Respir Crit Care Med*, 170:836–44, 2004.
- [82] Hasford J and Virchow JC. Excess mortality in patients with asthma on long-acting beta2-agonists. *Eur Respir J*, 28:900–2, 2006.
- [83] Taylor DR, Sears MR, and Herbison GP et al. Regular inhaled beta agonist in asthma: effects on exacerbations and lung function. *Thorax*, 48:134–8, 1993.
- [84] Drazen JM, Israel E, and Boushey HA et al. Comparison of regularly scheduled with asneeded use of albuterol in mild asthma. asthma clinical research network. *N Engl J Med*, 335:841–7, 1996.
- [85] Kraan J, Koeter GH, and vd Mark TW et al. Changes in bronchial hyperre-activity induced by 4 weeks of treatment with antiasthmatic drugs in patients with allergic asthma: a comparison between budesonide and terbutaline. *J Allergy Clin Immunol*, 76:628–36, 1985.

- [86] Keir S, Page C, and Spina D. Bronchial hyperresponsiveness induced by chronic treatment with albuterol: role of sensory nerves. *J Allergy Clin Immunol*, 110:388–94, 2002.
- [87] Huang EJ and Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24:677–736, 2001.
- [88] Zaidi SI, Jafri A, and Doggett T et al. Airway-related vagal preganglionic neurons express brain-derived neurotrophic factor and trkb receptors: implications for neuronal plasticity. *Brain Re*, 1044:133–43, 2005.
- [89] Hahn C, Islamian AP, and Renz H et al. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 117:787–794, 2006.
- [90] Bennedich Kahn L, Gustafsson LE, and Olgart Hoglund C. Brain-derived neurotrophic factor enhances histamine-induced airway responses and changes levels of exhaled nitric oxide in guinea pigs in vivo. *Eur J Pharmacol*, 595:78–83, 2008.
- [91] Lommatzsch M, Braun A, and Renz H. Neurotrophins in allergic airway dysfunction: what the mouse model is teaching us. *Ann N Y Acad Sci*, 992:241–9, 2003.
- [92] Pitchford SC, Momi S, and Baglioni S et al. Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 177:604–12, 2008.
- [93] Pitchford SC, Riffo-Vasquez Y, and Sousa A et al. Platelets are necessary for airway wall remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Blood*, 103:639–47, 2004.
- [94] Edwards MR, Haas J, and Panettieri RA et al. Corticosteroids and beta2 agonists differentially regulate rhinovirus-induced interleukin-6 via distinct cis-acting elements. *J Biol Chem*, 282:15366–75, 2007.
- [95] Shieh PB and Ghosh A. Molecular mechanisms underlying activity-dependent regulation of bdnf expression. *J Neurobiol*, 41:127–34, 1999.

- [96] Lommatzsch M, Klotz J, and Virchow JC. Postnatal dexamethasone for lung disease of prematurity. *N Engl J Med*, 350:2715–8, 2004.
- [97] Simons FE. A comparison of beclomethasone, salmeterol, and placebo in children with asthma. canadian beclomethasone dipropionate-salmeterol xinafoate study group. *N Engl J Med*, 337:1659–65, 1997.
- [98] Verberne AA, Frost C, and Roorda RJ et al. One year treatment with salmeterol compared with beclomethasone in children with asthma. the dutch paediatric asthma study group. *Am J Respir Crit Care Med*, 156:688–95, 1997.
- [99] Bleeker ER, Postma DS, and Lawrance RM et al. Effect of adrb2 polymorphisms on response to longacting beta2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *Lancet*, 370:2118–25, 2007.
- [100] Braak H and Braak E. Neuropathological staging of alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 82:239–259, 1991.
- [101] Kordower JH et al. Loss and atrophy of layer ii entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.*, 49:202–213, 2001.
- [102] Masliah E et al. Synaptic and neuritic alterations during the progression of alzheimer’s disease. *Neurosci. Lett.*, 174:67–72, 1994.
- [103] Nagahara AH et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of alzheimer’s disease. *Nature Med.*, 15:331–337, 2009.
- [104] Olanow CW and Tatton WG. Etiology and pathogenesis of parkinson’s disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22:123–144, 1999.
- [105] Mogi M et al. Brain-derived growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in parkinson’s disease. *Neurosci. Lett.*, 270:45–48, 1999.
- [106] Parain K et al. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in parkinson’s disease. *Neuroreport*, 10:557–561, 1999.

- [107] Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, and Kang UJ. Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in arat model of parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 15:7810–7820, 1995.
- [108] Frim DM et al. Implantated fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91:5104–5108, 1994.
- [109] Tsukahara T, Takeda M, and Shimohama S et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery*, 37:733–741, 1995.
- [110] Meyer S Tuszynski MH, Mafong E. Bdnf and nt-4/5 prevent injury-induced motor neuron degeneration in the adult central nervous system. *Neuroscience*, 71:761–771, 1996.
- [111] Giehl KM and Tetzlaff W. Bdnf and nt-3, but not ngf, prevent axotomy-induced death of rat corticospinal neurons in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, 8:1167–1175, 1996.
- [112] Mitumoto H et al. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with cntf and bdnf. *Science*, 265:1107–1110, 1994.
- [113] A controlled trial of recombinant methionyl human bdnf in als: the bdnf study group. *Neurology*, 52:1427–1433, 1999.
- [114] Beck M et al. Autonomic disfunction in als: a preliminary study on the effects of intrathecal bdnf. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, 6:100–103, 2005.
- [115] Ochs G et al. A phase i/ii trial of recombinant methionyl human brain-derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, 1:201–201, 2000.

- [116] Ankeny DP et al. Pegylated brain-derived neurotrophic factor shows improved distribution into the spinal cord and stimulates locomotor activity and morphological changes after injury. *Exp. Neurol.*, 170:85–100, 2001.
- [117] Pardridge WM, Wu D, and Sakane T. Combined use of carboxyl-directed protein pegylation and vector-mediated blood-brain barrier drug delivery system optimizes brain uptake of brain-derived neurotrophic factor following intravenous administration. *Pharm. Res.*, 15:576–582, 1998.
- [118] Castren E and Rantamäki T. The role of bdnf and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity. *Develop. Neurobiol.*, 70:289–297, 2010.
- [119] Cambell S, Marriott M, Nahmias C, and MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am. J. Psychiatry*, 161:598–607, 2004.
- [120] Dwivedi Y et al. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase b in postmortem brain of suicide subjects. *Arch. Gen. Psychiatry*, 60:804–815, 2003.
- [121] Brunoni AR, Lopes M, and Fegni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and bdnf-levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 11:1169–1180, 2008.
- [122] Taliaz D, Stall N, Dar DE, and Zangen A. Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. *Mol Psychiatry*, 15:80–92, 2010.
- [123] Vermetten E, Vythilingam M, and Southwick SM et al. Long-term treatment with paroxetine increases verbal declarative memory and hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry*, 54:693–702, 2003.
- [124] Sen S, Duman R, and Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression and antidepressant medications: meta-analysis and implications. *Biol. Psychiatry*, 64:527–532, 2008.

- [125] Shimizu E et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (bdnf) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*, 54:70–75, 2003.
- [126] Chen B, Dowlatsahi D, and MacQueen G et al. Increased hippocampal bdnf immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*, 50:260–265, 2001.
- [127] Castren E. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci*, 6:241–246, 2005.
- [128] Krystal JH, Tolin DF, and Sanacora G et al. Neuroplasticity as a target for the pharmacotherapy of anxiety disorders, mood disorders, and schizophrenia. *Drug Discov Today*, 14:690–697, 2009.
- [129] Groves JO. Is it time to reassess the bdnf hypothesis of depression? *Mol Psychiatry*, 12:1079–1088, 2007.
- [130] Nagahara AH and Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of bdnf in neurological and psychiatric disorders. *Nature*, 10:209–219, 2011.
- [131] Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, and Acheson AL et al. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*, 389:856–60, 1997.
- [132] Winkler J et al. Reversible schwann cell hyperplasia and sprouting of sensory and sympathetic neurites after intraventricular administration of nerve growth factor. *Ann. Neurol.*, 41:82–93, 1997.
- [133] Williams LR. Hypophagia is induced by intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *Exp. Neurol.*, 113:31–37, 1991.
- [134] Eriksson M, Jonhagen M et al. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, 9:246–257, 1998.
- [135] Hovland DN Jr. et al. Six-month continuous intraputamenal infusion toxicity study of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-methugdnf) in rhesus monkeys. *Toxicol. Pathol.*, 35:1013–1029, 2007.

- [136] Lang AE et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in parkinson disease. *Ann. Neurol.*, 59:459–466, 2006.
- [137] Tuszynski MH et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for alzheimer’s disease. *Nature Med.*, 11:551–555, 2005.
- [138] Marks WJ Jr. et al. Safety and tolerability of intraputamenal delivery of cere-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic parkinson’s disease: an open-label, phase i trial. *Lancet Neurol.*, 7:400–408, 2008.
- [139] Herzog CD et al. Expression, bioactivity and safety 1 year after adeno-associated viral vector type 2-mediated delivery of neurturin to the monkey nigrostriatal system support cere-120 for parkinson’s disease. *Neurosurgery*, 64:602–613, 2009.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Pathophysiologie der bronchialen Schleimhaut beim Asthma bronchiale	5
1.2	Innervation der Atemwege	6
1.3	Korrelation zwischen BDNF-Thrombozytenbeladung und Lungenfunktion	13
1.4	Mortalität und Verordnung von inhalativen Beta-Mimetika	15
1.5	Empfehlung der FDA 2010 zur Asthmatherapie mit LABAs	16
1.6	In Vitro-Freisetzung von BDNF aus Leukozyten	17
2.1	Studienanzeige in der Rostocker Ostseezeitung	18
2.2	Studienablauf	21
2.3	Ganzkörperplethysmograph der Fa. Jäger	23
2.4	Messung der Atemwegsreagibilität mittels Histaminprovokation . . .	26
2.5	Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips	28
3.1	Lungenfunktion zu Studienbeginn, nach Salmeterol-Monotherapie und nach Salmeterol/Fluticason-Kombinationstherapie	35
3.2	Bronchiale Hyperreagibilität zu Studienbeginn, nach Salmeterol-Monotherapie und nach Salmeterol/Fluticason-Kombinationstherapie	36
3.3	Serum- und Thrombozyten-BDNF zu Studienbeginn, nach Salmeterol-Monotherapie und nach Salmeterol/Fluticason-Kombinationstherapie	37
3.4	Zusammenhang zwischen BDNF und PC ₂₀	38
3.5	Zusammenhang zwischen der Änderung der bronchialer Hyperreagibilität und zwei Beta-Rezeptor-Polymorphismen	39
4.1	Hypothese	48

Tabellenverzeichnis

1.1	Beta-Mimetika in der Therapie obstruktiver Atemwegserkrankungen .	14
3.1	Patientencharakteristika und Lungenfunktionscharakteristika	32

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APC	Antigen presenting cells
Arg / arg	Arginin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	US Food and Drug Administration
FEV ₁	Forcierte expiratorische Vitalkapazität in der ersten Sekunde
GINA	Global Initiative for Asthma
Gln / gln	Glutamin
Glu / glu	Glutaminsäure
Gly / gly	Glycin
ICS	Inhalatives Corticosteroid
IgE	Immunglobulin E
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
IL-13	Interleukin-13
LABA	long acting beta-agonist
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MHC	Major histocompatibility complex
NANC	non-adrenerge und non-cholinerge Neurone
e-NANC	exzitatorische non-adrenerge und non-cholinerge Neurone
i-NANC	inhibitorische non-adrenerge und non-cholinerge Neurone
NGF	Nerve growth factor
NO	Stickstoffmonoxid

NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
PAF	Platelet-activating Factor
PC ₂₀	Histamindosis, die einen 20%igen Abfall der FEV ₁ bewirkt
PEF=Peak Flow	Peak expiratory flow (Atem-Spitzenfluss)
PGF _{2a}	Prostaglandin F _{2alpha}
p75NTR	p75 neurotrophin receptor
SABA	short acting beta-agonist
TNF	Tumornekrosefaktor
Trk	Tyrosin-Kinase-Rezeptor
TRP	Transient receptor potential
VIP	Vasointestinales Peptid
VLABA	very long acting beta-agonist
ZNS	Zentrales Nervensystem

Publikation

Lommatzsch M, **Lindner Y**, Edner A, Bratke K, Kuepper M and Virchow JC.

Adverse effects of salmeterol in asthma: a neuronal perspective.

Thorax 2009; 64:763-769

Impact Factor: 6,5

Zu dieser Publikation erschienen 2 Editorials in der Zeitschrift Thorax:

Editorial 1:

Page C

The Beta2 receptor and airway hyper-responsiveness: are sensory nerves involved?

Thorax 2009; 64:738-739

Editorial 2:

Johnston SL and Edwards MR

Mechanisms of adverse effects of Beta-agonists in asthma.

Thorax 2009; 64:739-741

Danksagung

Ich danke vor allen anderen Herrn PD Dr. med. Marek Lommatzsch für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses sehr interessanten Themas sowie für die engagierte Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Virchow für die Bereitstellung der notwendigen Arbeitsmittel innerhalb der Abteilung für Pneumologie der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. rer. nat. K. Bratke aus dem Immunologischen Labor der Abteilung für Pneumologie für die Unterstützung bei der Durchführung der ELISA-Messungen sowie Frau P. Thamm, welche mir im Labor ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch den Schwestern der Bronchoskopie gilt mein Dank für die Einweisung in die Arbeit mit dem Bodyplethysmographen sowie die Hilfestellungen bei Problemen.

Vielen Dank Mandy, Emil, Klara und Hannah für Toleranz und Geduld.

Ich danke von Herzen meinen fünf Männern - für alles.

Persönliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst habe. Ich habe keine Hilfsmittel außer den genannten verwendet.

Yvonne Rennau
im Juli 2011

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere
Medizin der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. Virchow

Wirkung von inhaliertem Salmeterol auf die bronchiale Hyperreagibilität und die BDNF-Thrombozytenbeladung von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale

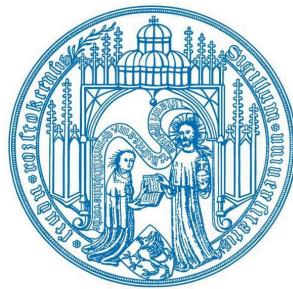
Thesen zur Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock



von Yvonne Rennau, geb. Lindner

geb. am 25.01.1982 in Rostock

Rostock 2011

Thesen

1. Inhalative Beta2-Mimetika sind potente antiobstruktive Medikamente in der Therapie des Asthma bronchiale, die entweder als Notfallspray oder in Kombination mit inhalativen Corticosteroiden in der Dauertherapie eingesetzt werden.
2. Als Monotherapie sind inhalative Beta2-Mimetika in der Therapie des Asthma bronchiale nicht zugelassen, da epidemiologische Studien wiederholt zeigten, dass sowohl kurzwirksame als auch langwirksame Beta-2-Mimetika zur Mortalitätssteigerung und zu einem Verlust an Asthmakontrolle führen. Die Ursachen dieses Paradoxons sind bis heute unklar.
3. Es wurde jedoch gezeigt, dass inhalative Beta2-Mimetika bei Patienten mit Asthma zu einer Steigerung der bronchialen Hyperreagibilität führen können. Diese Steigerung der bronchialen Hyperreagibilität könnte für die beobachtete Mortalitätssteigerung verantwortlich zeichnen. Der zugrunde liegende Mechanismus, der die Zunahme der bronchialen Hyperreagibilität durch inhalative Beta2-Mimetika erklärt, ist bislang nicht bekannt.
4. Das Neurotrophin Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ist ein essentieller und nachhaltiger Regulator neuronaler Aktivität im erwachsenen Nervensystem. Es wurde in verschiedenen tierexperimentellen und humanen Studien gezeigt, dass BDNF in der allergischen Atemwegsentszündung hochreguliert ist, und eine bronchiale Hyperreagibilität auslöst. BDNF gilt daher heute als ein wesentliches pathogenetisches Bindeglied zwischen Atemwegs-Entzündung und Atemwegs-Hyperreagibilität beim allergischen Asthma.
5. Bei Patienten mit allergischem Asthma korrelieren die systemischen BDNF-Spiegel mit der bronchialen Hyperreagibilität. Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass diese systemischen BDNF-Spiegel durch inhalative Corticosteroide gesenkt werden können. Der Einfluss von inhalativen Beta2-Mimetika auf die BDNF-Spiegel war jedoch bislang unbekannt.

6. In der vorliegenden klinischen Studie, die insgesamt 18 Patienten mit mildem allergischem Asthma vollendet haben, wurde erstmals gezeigt, dass eine zweiwöchige Therapie mit dem inhalativen Beta2-Mimetikum Salmeterol zu einer signifikanten Steigerung der systemischen BDNF-Spiegel führt.
7. Dieser Anstieg korrelierte signifikant mit der Verschlechterung der bronchialen Hyperreagibilität unter der Salmeterol-Monotherapie. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass der BDNF-Anstieg unter der Salmeterol-Monotherapie zur Verschlechterung der bronchialen Hyperreagibilität pathogenetisch beiträgt.
8. Eine anschließende zweiwöchige Kombinationstherapie mit Salmeterol und dem inhalativen Corticosteroid Fluticason führte zu einer signifikanten Senkung der erhöhten BDNF-Spiegel. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass die Sicherheit einer Kombinationstherapie bei Asthma bronchiale auf einer Aufhebung der neuronal schädlichen Salmeterol-Wirkung durch inhalative Corticosteroide beruht.
9. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen der Veränderung der bronchialen Hyperreagibilität unter Salmeterol-Monotherapie und verschiedenen Beta2-Rezeptor-Polymorphismen. Dies bestätigte die Ergebnisse aktueller epidemiologischer Studien, die keinen Zusammenhang zwischen Beta2-Rezeptor-Polymorphismen und der Wirksamkeit und Sicherheit der Salmeterol-Therapie bei Asthma bronchiale fanden.
10. Die vorliegende Arbeit hat somit erstmals eine mögliche pathogenetische Erklärung für die Zunahme der bronchialen Hyperreagibilität unter einer Monotherapie mit inhalativen Beta2-Mimetika wie Salmeterol bei Patienten mit allergischem Asthma aufgezeigt. Sie hat daher einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkung inhalativer Medikamente beim allergischen Asthma geleistet.